

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



JC997 U.S. PRO
09/941179
08/27/01



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 42 177.6

Anmeldetag: 28. August 2000

Anmelder/Inhaber: Bayer Aktiengesellschaft, Leverkusen/DE

Bezeichnung: Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten

IPC: C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 1. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Weber".

Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten

Die Erforschung betrifft modifizierte Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten, dafür codierende Nukleinsäuren, sowie ein Verfahren zum Auffinden von Wirkstoffen für den Pflanzenschutz bzw. pharmazeutischen Wirkstoffen für die Behandlung von Mensch und/oder Tier.

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die eine Rolle bei der Neurotransmission im Tierreich spielen. Die Bindung von Acetylcholin oder anderen Agonisten an den Rezeptor verursacht eine vorübergehende Öffnung des Kanals und gestattet den Durchstrom von Kationen. Man nimmt an, dass ein Rezeptor aus fünf Untereinheiten besteht, die sich um eine Pore gruppieren. Jede dieser Untereinheiten ist ein Protein, das aus einem extrazellulären N-terminalen Teil besteht, gefolgt von drei Transmembranregionen, einem intrazellulären Teil, sowie einer vierten Transmembranregion und einem kurzen extrazellulären C-terminalen Teil. Bestimmte Untereinheiten tragen auf ihrem extrazellulären Teil die Bindestelle für Liganden wie Acetylcholin. Zwei vicinale Cysteine sind Bestandteil dieser Bindestelle und daher gemeinsames Strukturmerkmal aller ligandenbindenden Untereinheiten, die auch als α -Untereinheiten bezeichnet werden. Untereinheiten ohne dieses Strukturmerkmal werden je nach Lokalisation und Funktion des Rezeptors als β -, γ -, δ - oder ϵ -Untereinheiten bezeichnet (Changeux et al. 1992).

Acetylcholinrezeptoren sind vor allem in Wirbeltieren gut untersucht. Anhand ihrer anatomischen Lokalisierung und ihrer funktionellen Eigenschaften (Leitungseigenschaften des Kanals, Desensibilisierung, Sensitivität gegenüber Agonisten und Antagonisten sowie gegenüber Toxinen wie z.B. α -Bungarotoxin) lassen sich hier drei Gruppen unterscheiden. Die Einteilung korreliert mit der molekularen Zusammensetzung der Rezeptoren. Es gibt heterooligomere Rezeptoren mit der Untereinheitenzusammensetzung $\alpha_2\beta\gamma\delta$, die im Muskel vorkommen (Noda et al. 1982, Claudio et al. 1983, Devillers-Thiery et al. 1983, Noda et al. 1983a, b), heterooligomere Rezeptoren mit der Untereinheitenzusammensetzung $\alpha_1\beta\gamma\delta$, die im Gehirn vorkommen (Noda et al. 1982, Claudio et al. 1983, Devillers-Thiery et al. 1983, Noda et al. 1983c), und homooligomere Rezeptoren mit der Untereinheitenzusammensetzung $\alpha_1\alpha_2\beta\gamma\delta$, die in Ganglionen vorkommen (Noda et al. 1982, Claudio et al. 1983, Devillers-Thiery et al. 1983, Noda et al. 1983d).

toren, die Untereinheiten aus der Gruppe $\alpha 2 - \alpha 6$ und $\beta 2 - \beta 4$ enthalten, und die im Nervensystem vorkommen (Schoepfer et al. 1990, Heinemann et al. 1997) sowie homooligomere Rezeptoren, die Untereinheiten aus der Gruppe $\alpha 7 - \alpha 9$ enthalten, und die ebenfalls im Nervensystem vorkommen (Lindstrom et al. 1997, Elgoyhen et al. 1997). Diese Einteilung wird auch durch eine Betrachtung der Verwandschaft der Gensequenzen der verschiedenen Untereinheiten gestützt. Typischerweise sind die Sequenzen funktionell homologer Untereinheiten verschiedener Spezies ähnlicher als Sequenzen von Untereinheiten aus verschiedenen Gruppen, aber der gleichen Spezies. Weiterhin sind die Gensequenzen aller bekannten Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten nicht nur untereinander in gewissem Maße ähnlich, sondern auch mit denen einiger anderer ligandengesteuerter Ionenkanäle (z.B. den Serotoninrezeptoren vom Typ 5HT₃, den GABA-gesteuerten Chloridkanälen, den Glycin-gesteuerten Chloridkanälen). Man geht daher davon aus, dass alle diese Rezeptoren von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen und ordnet sie in eine Supergenfamilie ein (Ortells et al. 1995).

In Insekten ist Acetylcholin der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. Dementsprechend lassen sich Acetylcholinrezeptoren an Präparaten zentraler Ganglien aus Insekten elektrophysiologisch nachweisen. Der Nachweis gelingt sowohl an post- als auch an präsynaptischen Nervenendigungen sowie an den Zellkörpern von Interneuronen, Motoneuronen und modulatorischen Neuronen (Breer et al. 1987, Buckingham et al. 1997). Unter den Rezeptoren gibt es solche, die durch α -Bungarotoxin inhibiert werden, und solche, die insensitiv sind (Schloß et al. 1988). Die Acetylcholinrezeptoren sind außerdem der molekulare Angriffspunkt wichtiger natürlicher (z.B. Nikotin) und synthetischer Insektizide (z.B. Chloronikotinyle).

Die Gensequenzen einer Anzahl von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren der Insekten sind bereits bekannt. So sind in *Drosophila melanogaster* die Sequenzen fünf verschiedener Untereinheiten beschrieben (Bossy et al. 1988, Hermanns-Borgmeyer et al. 1986, Sawruk et al. 1990a, 1990b, Schulz et al. 1998), in *Locusta*

migratoria ebenfalls fünf (Hermsen et al. 1998), in *Schistocerca gregaria* eine (Marshall et al. 1990), in *Myzus persicae* sechs (Sgard et al. 1998, Huang et al. 1999), in *Manduca sexta* zwei Sequenzen (Eastham et al. 1997, Genbank AJ007397) und in *Heliothis virescens* sechs (Genbank AF 096878, AF 096879, AF 096880, 5 AF143846, AF143847, AJ 000399). Zudem ist eine Reihe von partiellen Gensequenzen aus *Drosophila melanogaster* als sog. expressed sequence tags charakterisiert worden (Genbank AA540687, AA698155, AA697710, AA697326). Alle diese Sequenzen werden in α - und β -Untereinheiten klassifiziert, je nachdem, ob die zwei vicinalen Cysteine der Ligandenbindestelle vorhanden sind oder nicht.

10

15

20

25

30

Die rekombinante Expression nikotinischer Rezeptoren aus Insekten hat sich als schwieriger erwiesen als die der analogen Rezeptoren aus Vertebraten oder *C. elegans*. So ist es bisher nicht gelungen, nikotinische Rezeptoren, die nur aus Untereinheiten von Insekten bestehen, so zu exprimieren, dass ihre funktionalen Eigenschaften denen natürlicher Rezeptoren gleichen (Marshall et al. 1990, Amar et al. 1995, Hermsen et al. 1998, Sgard et al. 1998). Relevante funktionale Eigenschaften sind z.B. die Empfindlichkeit gegen Agonisten und Antagonisten, die Leitfähigkeit für Ionenströme oder die Desensitivierung. Zumindest einige α -Untereinheiten aus verschiedenen Insektspezies tragen jedoch zu einem funktionellen Rezeptor bei, wenn statt einer Insekten- β -Untereinheit eine nicht- α -Untereinheit aus Vertebraten koexprimiert wird. In Oocyten von *Xenopus laevis* ist die ligandeninduzierte Leitfähigkeit solcher hybrider Rezeptoren untersucht worden. Kombinationen z.B. der *Drosophila* $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - oder $\alpha 3$ -Untereinheit mit der $\beta 2$ -Untereinheit von Huhn oder Ratte führen zu Rezeptoren, die in ihrer Empfindlichkeit gegen Agonisten und Antagonisten oder ihrer Leitfähigkeit für Ionenströme solchen Rezeptoren ähneln, die in Nativpräparaten nachgewiesen werden (Bertrand et al. 1994, Lansdell et al. 1997, Schulz et al. 1998, 2000, Matsuda et al. 1998). Dagegen konnte in Zelllinien die Expression hybrider Rezeptoren, die z.B. aus Kombinationen der *Myzus persicae* $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - oder $\alpha 3$ -Untereinheit mit der $\beta 2$ -Untereinheit der Ratte oder aus Kombinationen der *Drosophila* $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - oder $\alpha 3$ -Untereinheit mit der $\beta 2$ - oder $\beta 4$ -Untereinheit der Ratte bestehen, bisher nur durch die Bindung nikotinischer Liganden (Lans-

dell et al. 1997, 2000, Huang et al. 1999) nachgewiesen werden. Die ligandeninduzierte Leitfähigkeit solcher Rezeptoren wurde bisher in keinem einzigen Fall nachgewiesen.

- 5 Einen weiteren Versuch der Annäherung an die Expression nikotinischer Rezeptoren aus Insekten stellen chimäre Untereinheiten dar (van den Beukel 1998). In die Gensequenz der α 7-Untereinheit der Ratte wurden gentechnisch Abschnitte der Gensequenz der α 2-Untereinheit aus Drosophila eingefügt. Die Expression der Chimären in Oocyten von Xenopus laevis konnte durch Bindung nikotinischer Liganden nachgewiesen werden, aber auch diese Rezeptoren wiesen keine ligandeninduzierte Leitfähigkeit auf.

10 Die rekombinante Ausprägung nikotinischer Rezeptoren aus Insekten oder solcher nikotinischer Rezeptor-Konstrukte, die den Rezeptoren aus Insekten in ihrer Empfindlichkeit gegen Agonisten und Antagonisten und in ihrer ligandeninduzierten Leitfähigkeit für Ionenströme entsprechen, in eukaryotischen Zelllinien ist nicht nur ein bisher ungelöstes wissenschaftliches Problem, sondern ist auch von großer praktischer Bedeutung, beispielsweise für die Etablierung von Testsystemen mit hohem Durchsatz für die Suche nach neuen Wirkstoffen für den Pflanzenschutz bzw. pharmazeutischen Wirkstoffen für die Behandlung von Mensch und/oder Tier.

15 Der vorliegenden Erfindung liegt somit insbesondere die Aufgabe zu Grunde, ein Testverfahren bzw. die Bestandteile eines Testverfahrens zur Verfügung zu stellen, mit dem Verbindungen aufgefunden werden können, welche als Modulatoren, insbesondere als Agonisten oder Antagonisten, die Leitungseigenschaften nikotinischer Rezeptoren aus Insekten verändern. Solche Verbindungen können als Wirkstoffe für den Pflanzenschutz bzw. pharmazeutische Wirkstoffe für die Behandlung von Mensch und/oder Tier genutzt werden.

20 25 30 Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung von modifizierten Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten, wobei zumindest eine Aminosäure im Bereich einer α -Unter-

einheit eines Vertebraten-Acetylcholinrezeptors, welcher zu der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 homolog ist, durch eine Aminosäure, die an der identischen Position in dem entsprechenden Bereich einer α -Untereinheit eines Insekten-Acetylcholinrezeptors vorkommt, ersetzt ist.

5

Zur Beschreibung der auszutauschenden Aminosäure(n) bzw. des auszutauschenden Bereichs dient wegen der unterschiedlichen Numerierung strukturell und/oder funktional entsprechender Bereiche in Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten verschiedener Spezies die α -Untereinheit des Rochens *Torpedo californica* als Maßstab. Die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 entspricht demjenigen Bereich der α -Untereinheit von *Torpedo californica*, der mit der Aminosäure, die mit 123 gekennzeichnet ist, beginnt und mit der Aminosäure, die mit 167 gekennzeichnet ist, endet. Die Numerierung wurde übernommen aus dem Eintrag "Acetylcholine Receptor Protein, Alpha Chain Precursor" der Swissprot-Datenbank (P02710). Die Entsprechung der Aminosäurepositionen kann durch Sequenzvergleich der Aminosäuren anderer Untereinheiten von Acetylcholinrezeptoren aus Vertebraten mit üblichen Methoden festgestellt werden. Eine übliche Methode beinhaltet die Verwendung der Programme "Gap" bzw. "Pileup" aus dem Programm Paket GCG Version 10.0 (GCG Genetics Computer Group, Inc., Madison Wisconsin, USA) zum Vergleich zweier bzw. mehrerer Aminosäuresequenzen. Es können auch das ClustalX Programm (Version 1.81) (Thompson et al. 1997, IGBMC, Straßburg, Frankreich) oder andere ähnliche Programme verwendet werden. Die Programme werden mit Standardeinstellungen verwendet.

10

15

20

25

Die zu vergleichenden Sequenzen umfassen den Bereich vom N-Terminus des Proteins bis zur ersten Transmembranregion. Als "an der identischen Position vorkommend" gelten solche Aminosäuren, die von den Sequenzvergleichsprogrammen untereinander angeordnet werden.

30

Bevorzugt sind in den erfundungsgemäßen Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten mindestens vier, besonders bevorzugt mindestens sieben, ganz besonders bevorzugt alle Aminosäuren in dem oben beschriebenen Bereich einer α -Untereinheit eines Ver-

tebraten-Acetylcholinrezeptors durch die entsprechende Anzahl von Aminosäuren einer α -Untereinheit eines Insekten-Acetylcholinrezeptors ersetzt.

Solche modifizierten Untereinheiten weisen eine höhere Sensitivität für insektizide
5 Wirkstoffe, wie z.B. Imidacloprid, auf als eine nicht-modifizierte Untereinheit. Die Abbildung 1 illustriert den Sequenzvergleich, die Entsprechungen und den beschriebenen Bereich beispielhaft mit einigen Untereinheiten.

Bevorzugt handelt es sich bei den oben erwähnten α -Untereinheiten von Acetylcholin-
10 rezeptoren aus Vertebraten um neuronale Untereinheiten von Maus, Ratte, Huhn, Hund, Zebrafisch, Rhesusaffe, Rind oder Schwein.

Bevorzugt handelt es sich bei den oben erwähnten α -Untereinheiten von Acetylcholin-
rezeptoren aus Insekten um die $\alpha 2$ -Untereinheit oder die $\alpha 3$ -Untereinheit von Myzus
15 persicae, oder um die $\alpha 1$ -Untereinheit von Heliothis virescens oder Manduca sexta, oder um die $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - oder $\alpha 3$ -Untereinheit von Drosophila melanogaster.

Besonders bevorzugt ist eine modifizierte Acetylcholinrezeptor-Untereinheit mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 3.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Acetylcholinrezeptoren, welche die erfindungsgemäßen Untereinheiten umfassen. Als strukturelle Partner der erfindungsgemäßen Untereinheiten enthalten diese Rezeptoren bevorzugt eine $\beta 2$ -Untereinheit von Maus, Ratte, Huhn, Hund, Zebrafisch, Rhesusaffe, Rind oder Schwein.
25

Auch die nicht-modifizierten Bereiche der erfindungsgemäßen Untereinheiten müssen nicht identisch mit den entsprechenden Bereichen natürlich vorkommender α -Untereinheiten von Vertebraten-Acetylcholinrezeptoren sein, solange gewährleistet ist, dass die Rezeptoren eine ligandeninduzierte Leitfähigkeit für Ionenströme aufweisen.
30

Solche Unterschiede können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einer α -Untereinheit vorkommen, wie beispielsweise an dem Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, 5 kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildung, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, 10 Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

Weiterhin können die erfundungsgemäßen Untereinheiten im Vergleich zu den entsprechenden Bereichen natürlich vorkommender Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie noch die oben erwähnte Leitfähigkeit vermitteln können. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

- 20 1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
- 25 5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys

Ursprünglicher Rest	Substitution
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Nukleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen Untereinheiten codieren.

- 5 Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich insbesondere um einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genomicscher DNA, die Introns enthalten können, und cDNAs.
- 10 Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellt eine cDNA dar, welche die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2 besitzt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin DNA-Konstrukte, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und einen heterologen Promotor umfassen.

Der Ausdruck "heterologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf
5 einen Promotor, der andere Eigenschaften als derjenige Promotor aufweist, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert. Der Ausdruck "Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich allgemein auf Expressionskontrollsequenzen.

10 Die Auswahl von heterologen Promotoren ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen oder zellfreie Systeme verwendet werden. Beispiele für heterologe Promotoren sind der frühe oder späte Promotor des SV40, des Adenovirus oder des Cytomegalovirus, der "immediate early" Promotor aus Baculovirus, der Metallothionein-Promotor aus Drosophila melanogaster, das lac-System, das trp-
15 System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen lambda, die Kontrollregionen des fd-Hüllproteins, der Promotor der 3-Phosphoglyceratkinase, der Promotor der Sauren Phosphatase und der Promotor des α -Mating-Faktors der Hefe.

20 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Vektoren, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure bzw. ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Plasmide, Phasmide, Cosmide, YACs oder künstliche Chromosomen verwendet werden.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten.

Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, wie Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, vorzugsweise *E. coli*, als auch eukaryotische Zellen, wie Hefen, Säuger-, Amphibien-, Insekten- oder Pflanzenzellen. Bevorzugte eukaryotische Wirtszellen sind HEK-293-,
30

Schneider S2-, Spodoptera Sf9-, CHO-, COS1-, COS7-Zellen und Pflanzenzellen in Zellkultur.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Untereinheiten. Zur Herstellung der Untereinheiten, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren codiert werden, können Wirtszellen, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Dabei kann die zu exprimierende Nukleinsäure an die "Codon Usage" der Wirtszellen angepasst werden. Die gewünschten Untereinheiten können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem Kulturmedium isoliert werden. Die Untereinheiten können auch in in vitro-Systemen hergestellt werden.

Ein schnelles Verfahren zum Isolieren der erfindungsgemäßen Untereinheiten, die von Wirtszellen unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure synthetisiert werden, beginnt mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise Glutathion S-Transferase sein. Das Fusionsprotein kann dann an einer Glutathion-Affinitätssäule gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und der zu reinigenden erfindungsgemäßen Untereinheit abgetrennt werden. Der Linker kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden.

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie.

30

Da Acetylcholinrezeptoren aus Membranproteinen aufgebaut sind, werden in den Reinigungsverfahren vorzugsweise Detergensextraktionen durchgeführt, beispielsweise unter Verwendung von Detergenzien, die die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Polypeptide nicht oder nur wenig beeinflussen, wie nicht-ionische Detergenzien.

5

Die Reinigung der erfindungsgemäßen Untereinheiten kann die Isolierung von Membranen ausgehend von Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren exprimieren, umfassen. Vorzugsweise exprimieren solche Zellen die erfindungsgemäßen Polypeptide in einer ausreichenden Kopienanzahl, so dass die Menge der Polypeptide in einer Membranfraktion mindestens 10-fach höher ist als diejenige, die in vergleichbaren Membranen von Zellen gefunden wird, die Acetylcholinrezeptoren natürlicherweise exprimieren; besonders bevorzugt ist die Menge mindestens 100-fach, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000-fach höher.

10

15 Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden, bedeuten, dass die erfindungsgemäßen Untereinheiten von anderen Proteinen oder anderen Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden. Vorzugsweise ist eine die erfindungsgemäßen Untereinheiten enthaltende Zusammensetzung hinsichtlich des Proteingehalts gegenüber einer Präparation aus den Wirtszellen mindestens 10-fach und besonders bevorzugt mindestens 100-fach angereichert.

20

Die erfindungsgemäßen Untereinheiten können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

25

Ferner sind auch Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise können die Nuklein-säuremoleküle vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch Genfragmente, z.B. aus Genen für Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten aus Insekten, in das 30 Gen von Interesse, z.B. ein Gen für eine Acetylcholinrezeptor-Untereinheit von Vertebraten, einführen. Dazu können Restriktionsschnittstellen ausgenutzt werden oder

auch geeignete Restriktionsschnittstellen geschaffen werden, beispielsweise mit den Methoden der "site-directed mutagenesis" oder der PCR. Schließlich können Gene für Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten von Interesse auch direkt mit den Methoden der "site-directed mutagenesis" oder der PCR verändert werden, um die gewünschten 5 Eigenschaften und Strukturmerkmale zu erzielen. Auch die homologe Rekombination zwischen DNA-Sequenzen bietet eine Möglichkeit zur gezielten Veränderung der Gene.

Für PCR-Verfahren werden chemisch synthetisierte Oligonukleotide als Primer eingesetzt. Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bedeutet 10 DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden chemisch synthetisiert.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren bzw. Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten können neue Wirkstoffe für den Pflanzenschutz bzw. pharmazeutische Wirkstoffe für die Behandlung von Mensch und Tier, wie chemische Verbindungen, welche 15 als Modulatoren, insbesondere als Agonisten oder Antagonisten, die Eigenschaften der erfindungsgemäßen Acetylcholinrezeptoren verändern, identifiziert werden. Dazu wird ein rekombinantes DNA-Molekül, das zumindest eine erfindungsgemäße Nukleinsäure 20 umfasst, in eine geeignete Wirtszelle eingebracht. Die Wirtszelle wird in Gegenwart einer oder mehrerer Verbindung unter Bedingungen kultiviert, die die Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren erlauben. Die Detektion veränderter Leitungseigenschaften ermöglicht das Auffinden beispielsweise insektizider Substanzen.

25 Veränderungen der Rezeptoreigenschaften wie z.B. Öffnung des Kanals, fehlende Öffnung des Kanals trotz Anwesenheit eines Agonisten in ausreichender Konzentration, veränderte Öffnungswahrscheinlichkeit oder -dauer führen zu entsprechenden Veränderungen des Ionenstroms durch den Kanal. Diese können z.B. mit elektrophysiologischen Methoden direkt verfolgt werden (Gopalakrishnan et al 1995, Buisson et al. 1996, Stutzer et al. 1996, Ragozzino et al. 1997). Auch radioaktiv markierte Ionen wie 30 z.B. ⁸⁶Rb-Ionen erlauben eine direkte Verfolgung des Ionenstroms (Gopalakrishnan et

al. 1996). Es kann auch die aus dem Ionenstrom resultierende Veränderung des Membranpotentials mit spannungssensitiven Farbstoffen dargestellt werden. Biologische Spannungssensoren sind ebenfalls beschrieben. Veränderungen des Membranpotentials führen in Zellen weiterhin zu einer Vielzahl von physiologischen Veränderungen, die 5 mittelbar oder unmittelbar nachweisbar sind, wie z.B. Öffnung, Schließung, veränderte Öffnungswahrscheinlichkeit oder -dauer von spannungsabhängigen Ionenkanälen. Diese können ebenfalls mit den oben beschriebenen Methoden detektiert werden. Falls der Ionenstrom durch den Acetylcholinrezeptor Calciumionen enthalten kann, oder falls der Ionenstrom durch einen sekundär geöffneten Kanal Calciumionen enthalten 10 kann, kann die Konzentrationsänderung des freien intrazellulären Calciums z.B. mit Calcium-sensitiven Farbstoffen nachgewiesen werden (Stetzer et al. 1996, Delbono et al. 1997, Staudermann et al. 1998, Zhang et al. 1999). Weitere bekannte Verfahren zum Nachweis der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration sind die Verwendung biolumineszenter Proteine oder der Einsatz von Reportergen-Konstrukten.

15 Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das Acetylcholinrezeptoren aktiviert.

20 Der Ausdruck "Antagonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, nach dessen Bindung die Aktivierung des Rezeptors evtl. selbst nach Binden eines Agonisten ausbleibt.

25 Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfundungsgemäßen Rezeptoren binden. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptides oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die erfundungsgemäßen Rezeptoren bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können Mimetika von natürlichen Substraten und Liganden darstellen.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Modulatoren um kleine organisch-chemische Verbindungen.

Erläuterungen zum Sequenzprotokoll und zu den Abbildungen:

SEQ ID NO: 1 zeigt einen Aminosäuresequenzbereich aus der α -Untereinheit von Torpedo californica;

5 SEQ ID NO: 2 zeigt die Nukleotidsequenz einer erfundungsgemäßen α -Untereinheit;

SEQ ID NO: 3 zeigt die von SEQ ID NO:2 abgeleitete Aminosäuresequenz;

SEQ ID NO: 4 zeigt die Sequenz des Primers 1 aus Beispiel 1A;

SEQ ID NO: 5 zeigt die Sequenz des Primers 2 aus Beispiel 1A;

SEQ ID NO: 6 zeigt die Nukleotidsequenz der Ligandenbindedomäne der $\alpha 1$ -Untereinheit von Heliothis virescens;

10 SEQ ID NO: 7 zeigt die von SEQ ID NO: 6 abgeleitete Aminosäuresequenz;

SEQ ID NO: 8 zeigt die Sequenz des Primers 1 aus Beispiel 1B;

SEQ ID NO: 9 zeigt die Sequenz des Primers 2 aus Beispiel 1B;

SEQ ID NO: 10 zeigt die Nukleotidsequenz der "insektentypischen Insertion"

15 SEQ ID NO: 11 zeigt die von SEQ ID NO: 10 abgeleitete Aminosäuresequenz;

SEQ ID NO: 12 zeigt die Sequenz des Primers 1 aus Beispiel 1C;

SEQ ID NO: 13 zeigt die Sequenz des Primers 2 aus Beispiel 1C;

SEQ ID NO: 14 zeigt die Nukleotidsequenz der Nukleinsäure aus Beispiel 1D;

SEQ ID NO: 15 zeigt die von SEQ ID NO: 14 abgeleitete Aminosäuresequenz;

20 SEQ ID NO: 16 zeigt die Sequenz des Primers 1 aus Beispiel 1D;

SEQ ID NO: 17 zeigt die Sequenz des Primers 2 aus Beispiel 1D;

SEQ ID NO: 18 zeigt die Sequenz des Primers 1 für die Konstruktion des Vektors pBluescript KS⁺ -delta SacI;

SEQ ID NO: 19 zeigt die Sequenz des Primers 2 für die Konstruktion des Vektors

25 pBluescript KS⁺ -delta SacI;

SEQ ID NO: 20 zeigt die Sequenz des Primers 3 aus Beispiel 1D;

SEQ ID NO: 21 zeigt die Sequenz des Primers 4 aus Beispiel 1D.

30 Die Abbildung 1 zeigt einen Sequenzvergleich von α -Untereinheiten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren verschiedener Insekten- und Vertebratenspezies im Bereich der ligandenbindenden Domäne. Die aufgeführten Sequenzen wurden mit Hilfe des

ClustalX Programmes (Version 1.81) im Bereich der putativen ligandenbindenden Domäne (Changeux et al. 1992) aligniert. Die zwischen der Heliothis- α 1- und der Huhn- α 4-Untereinheit ausgetauschten Bereiche sind umrandet. Fett gedruckt sind dabei die Aminosäuren, welche durch die Klonierung in die α 4-Untereinheit des Huhns eingeführt wurden. Die mit einem Stern markierten Aminosäurepositionen sind essentiell für die Bindung des Acetylcholins (Changeux et al. 1992). Die mit einem Pfeil versehenen Stellen markieren den Anfang und das Ende des in SEQ ID NO: 6 ausgetauschten Bereiches

10 Die Abbildung 2 zeigt Strom-Zeit-Kurven, die von in Xenopus-Oocyten exprimierten Acetylcholinrezeptoren abgeleitet wurden:

- A: Rezeptoren enthaltend Untereinheiten gemäß SEQ ID NO: 3 und Huhn β 2
- B: Rezeptoren enthaltend Huhn α 4- und Huhn β 2-Untereinheiten
- 15 C: Rezeptoren enthaltend Heliothis virescens α 1- und Huhn β 2-Untereinheiten
- D: Rezeptoren enthaltend Untereinheiten gemäß SEQ ID NO: 7 und Huhn β 2
- E: Rezeptoren enthaltend Untereinheiten gemäß SEQ ID NO: 11 und Huhn β 2
- F: Rezeptoren enthaltend Untereinheiten gemäß SEQ ID NO: 15 und Huhn β 2

20 Die Abbildung 3 zeigt zeigt Strom-Zeit-Kurven, die von in Sf9 exprimierten Acetylcholinrezeptoren abgeleitet wurden:

- A: Rezeptoren enthaltend Huhn α 4- und Huhn β 2-Untereinheiten
- B: Rezeptoren enthaltend Untereinheiten gemäß SEQ ID NO: 3 und Huhn β 2

25 Die Abbildung 4 zeigt den Anstieg des intrazellulären Calciums in Sf9-Zellen, die die Rezeptoren gemäß SEQ ID NO: 3 und Huhn β 2 (oben) bzw. Huhn α 4- und Huhn β 2-Untereinheiten (unten) exprimierten.

Beispiele:

Allgemeines

5 Es wurden verschiedene Nukleinsäuren generiert, die für modifizierte α -Untereinheiten codieren.

Neben der Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 2 wurden auch Nukleinsäuren auf Basis der Huhn $\alpha 4$ -Untereinheit erzeugt, welche entweder größere Bereiche (SEQ ID NO: 6) oder aber kleinere Bereiche aus dem ligandenbindenden Aminosäurebereich der Heliothis virescens $\alpha 1$ -Untereinheit (SEQ ID NO: 10, 14) enthalten. Mit keiner der drei entsprechenden modifizierten α -Untereinheiten konnte die gestellte Aufgabe gelöst werden. Die Untereinheit gemäß SEQ ID NO: 7 besitzt zwar im Oocyten-Expressionsystem zusammen mit der Huhn $\beta 2$ -Untereinheit eine deutliche Empfindlichkeit für Insektizide des Chlornikotinyl-Typs, ist aber in Zelllinien (z.B. Spodoptera frugiperda SF 9-Zellen oder HEK 293-Zellen) nicht funktionell ausprägbar. Dies entspricht dem Verhalten der Wildtyp $\alpha 1$ -Untereinheit aus Heliothis in Kombination mit der Huhn $\beta 2$ -Untereinheit.

20 Bei den α -Untereinheiten gemäß SEQ ID NO: 11, 15 war keine Empfindlichkeit für Insektizide des Chlornikotinyl-Typs nachweisbar. Ihre pharmakologischen Eigenschaften entsprechen denen des Wildtyp Huhn $\alpha 4/\beta 2$ -Rezeptors und sind damit nicht für die oben genannte Fragestellung geeignet.

25 Somit ist es von entscheidender Bedeutung für die Kombination der guten Expressionseigenschaften der $\alpha 4$ -Untereinheit aus dem Huhn und der gewünschten insektenartigen Pharmakologie der Heliothis virescens $\alpha 1$ -Untereinheit, einen eng definierten Bereich innerhalb der Ligandenbindedomäne der α -Untereinheiten auszutauschen. Das Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 3 enthält diesen Bereich.

Beispiel 1

Konstruktion der beschriebenen Nukleinsäuren

5 Allgemeines

Die Manipulation von Polynukleotiden erfolgte nach Standardmethoden der rekombinanten DNA Technologie (Sambrook et al. 1989). Die bioinformatische Bearbeitung von Nukleotid- und Proteinsequenzen erfolgten mit dem Programmpaket GCG
10 Version 10.0 (GCG Genetics Computer Group, Inc., Madison Wisconsin, USA).

A) Konstruktion der Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 2

- a) Bei einem pBluescript KS⁺ (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) wurde
15 mittels Quickchange (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) nach Angaben
des Herstellers unter Verwendung der folgenden Oligonukleotide: SEQ ID
NO: 18 (5'-GAACAAAAGCTGGAGGTCCACCGCGGTGGC-3') und SEQ
ID NO: 19 (5'-GCCACCGCGGTGGACCTCCAGCTTTGTTC-3') die
SacI-Restriktionsschnittstelle entfernt.
20
b) Als Templat für eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) diente die cDNA
der α1-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors von Heliothis
virescens (Genbank AJ000399) im Vektor pBluescript KS⁺ (10ng/μl). Als
Primer wurden Oligonukleotide der Sequenz SEQ ID NO: 4 (5'-
25 CACGTGCCCTCCGAGCTCATCTGGCGGCCGG-3') für das 5'-Ende des
zu amplifizierenden Fragments und SEQ ID NO: 5 (5'-
GTCATATGTCCACGAGCCGAAC-3') für das 3'-Ende des Fragments in
einer Konzentration von jeweils 15 pmol/μl eingesetzt. Die verwendete
Polymerase war PfuTurbo (Stratagene, Heidelberg, Deutschland). Betain
30 wurde als 5 M Stammlösung in Wasser eingesetzt. Die Nukleotid-Stammlö-
sung enthielt alle 4 Nukleotide in einer Konzentration von je 1mM.

Ansatz: 51,4µl H₂O

10 µl 10x PfuTurbo Puffer (Stratagene, Heidelberg, Deutschland)

2 µl Templat-DNA (20ng)

5 2 µl d'NTP mix, jeweils 1mM

2 µl Primer für das 5'-Ende

2 µl Primer für das 3'-Ende

2,6 µl Dimethylsulfoxid (wasserfrei)

26 µl Betain

10 2 µl PfuTurbo Polymerase (Stratagene, Heidelberg, Deutschland)

PCR Prog.: (1) 95°C 1min

(2) 95°C 30sec

15 (3) 55°C 30sec

(4) 72°C 30sec, 29 mal zurück zu (2)

(5) 4°C Pause

20 Nach der PCR wurde das Reaktionsprodukt mittels TOPO-TA Kit (Invitrogen, La Jolla, CA, USA) nach Angaben des Herstellers in einen TOPO-TA Vektor subkloniert. Eine Kolonie, die ein Plasmid mit dem amplifizierten Fragment enthielt, wurde mit Hilfe von Restriktionsverdau identifiziert. Aus ihr wurde Plasmid-DNA mit üblichen Methoden gewonnen. Aus dieser DNA wurde ein SacI/NdeI-Fragment mit üblichen Methoden isoliert.

25 Parallel dazu wurde die cDNA der α4-Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors des Huhns (Genbank AJ250361) in den oben beschriebenen Vektor gemäß 1Aa (pBluescript KS⁺ ohne Sac I) über flankierende EcoRI-Schnittstellen kloniert.

30 Dieses Plasmid wurde anschließend mit SacI und NdeI verdaut.

Das SacI/NdeI-Fragment wurde mit üblichen Methoden in die geöffnete cDNA der $\alpha 4$ -Untereinheit des Huhns ligiert. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde mit üblichen Methoden in kompetente E.coli Zellen des Stammes DH5 α (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) transformiert.

5

Eine Kolonie, die ein Plasmid mit dem einligierten Fragment enthielt, wurde mit Hilfe von Restriktionsverdaus identifiziert. Aus ihr wurde Plasmid-DNA mit üblichen Methoden gewonnen. Aus dieser DNA wurde ein BamHI/Eco47III-Fragment isoliert.

10

Parallel dazu wurde die cDNA der $\alpha 4$ -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholinrezeptors des Huhns mit BamHI und Eco47III verdaut. Die cDNA war kloniert in den Vektor pcDNA3.1 $^+$. Das BamHI/Eco47III-Fragment wurde mit üblichen Methoden in die geöffnete cDNA der $\alpha 4$ -Untereinheit des Huhns ligiert. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde in kompetente E.coli Zellen des Stammes DH5 α transformiert.

15

Eine Kolonie, die ein Plasmid mit dem einligierten Fragment enthielt, wurde mit Hilfe von Restriktionsverdaus identifiziert. Aus ihr wurde Plasmid-DNA mit üblichen Methoden gewonnen. Diese Plasmid-DNA wurde für Injektionen in Xenopus-Oocyten verwendet.

20

B) Konstruktion einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 6

25

Mittels PCR mit den folgenden Oligonukleotiden: SEQ ID NO: 8 (5'-CCGGAGCTCATCTGGCGGCCGGACATAGTC-3') und SEQ ID NO: 9 (5'-CCGAGATCTCGTCGCAGCACGTGTAGAACT-3') wurde der Bereich zwischen Aminosäure 113 und Aminosäure 239 des Vorläufers (siehe auch Abbildung 1) der $\alpha 1$ -Untereinheit von Heliothis virescens (Genbank AJ000399) im Vektor pBluescript KS $^+$ (10ng/ μ l) amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen für SstI und BglII versehen.

30

Der Ansatz für die PCR sah wie folgt aus:

Ansatz: 51,4 µl H₂O
5 10 µl 10x PfuTurbo Puffer (Stratagene, Heidelberg, Deutschland)
 2 µl Templat-DNA (20ng)
 2 µl d'NTP mix, jeweils 1mM
 2 µl Primer für das 5'-Ende
 2 µl Primer für das 3'-Ende
10 2,6 µl Dimethylsulfoxid (wasserfrei)
 26 µl Betain
 2 µl PfuTurbo Polymerase (Stratagene, Heidelberg, Deutschland)

PCR Prog.: (1) 95°C 1min
15 (2) 95°C 30sec
 (3) 55°C 30sec
 (4) 72°C 30sec, 29 mal zurück zu (2)

20 (5) 4°C Pause

- a) Im Anschluss an die PCR wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen SstI und BglII verdaut.
- b) Parallel dazu wurde die DNA der Huhn α4-Untereinheit (Genbank AJ250361) im Vektor gemäß 1Aa mit den Restriktionsenzymen SacI und BglII verdaut. Anschließend wurde das Fragment zwischen der SacI- und der BglII-Schnittstelle vom Rest des linearisierten Plasmids durch Agarosegelektrophorese entfernt.

Die Fragmente aus a) und b) wurden dann nach üblichen Verfahren miteinander
ligiert und die Ligationsprodukte in Bakterien des Stammes XL-1-Blue (Stratagene,
Heidelberg, Deutschland) transformiert. Eine Kolonie, die ein Plasmid mit dem ein-
5 ligierten Fragment enthielt, wurde mit Hilfe von Restriktionsverdau identifiziert.
Aus ihr wurde Plasmid-DNA mit üblichen Methoden gewonnen. Diese Plasmid-
DNA wurde für Injektionen in Xenopus-Oocyten verwendet.

C) Konstruktion einer Nukleinsäure gemäß SEO ID NO: 10

10

In die DNA der Huhn α 4-Untereinheit (Genbank AJ250361) im Vektor gemäß 1Aa wurde durch Quickechange Mutagenese (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) die sogenannte insektentypische Insertion (codierend für RHIDEARGTNVVELG) eingefügt. Die Mutagenese wurde nach Angaben des Herstellers mit Hilfe der folgenden Oligonukleotide durchgeführt: SEQ ID NO: 12 (5'-GCTAAGATAGACTTGAGACACATCGATGAGGCTAGAGGAACCAACGTGGTAGAACTGGGTGTGGACCAACTGGACTACTGG-3') und SEQ ID NO: 13 (5'-CCAGTAGTCCAGTTGGTCCACACCCAGTTCTACCACCGTTGGTTCCCTCTAGCCTCATCGATGTGTCTCAAGTCTATCTTAGC-3')

20

D) Konstruktion einer Nukleinsäure gemäß SEO ID NO: 14

Die Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 14 wurde ausgehend von der Huhn α4-Untereinheit (Genbank AJ250361) im Vektor gemäß 1Aa durch eine zweistufige Quickchange Mutagenese (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) nach Angaben des Herstellers erzeugt. Für die erste Reaktion fanden folgende Oligonukleotide Verwendung:

SEQ ID NO: 16 (5'-
CAACAGCAAGAAATATGAATGCTGCGACGAGCCCTACCTTGATATAACTT
30 TCAACTTCATTATCCGGAGGCTGCCGCTG-3') und SEQ ID NO: 17 (5'-
CAGCGGCAGCCTCCGGATAATGAAGTTGAAAGTTATATCAAGGTAGGGC

TCGTCGCAGCATTCATATTCTTGCTGTTG-3'). Dieses Produkt wurde anschließend einer zweiten Quickchange Mutagense mit folgenden Oligonukleotiden unterzogen: SEQ ID NO: 20 (5'-GC GGG GAG TGG GTC ATC TTAGAA GTC CCG GCC GTT CGC AAC GAA AAG TTT TAT ACA TGC TGC GAC GAG CCC 5 TAC C-3') und SEQ ID NO: 21 (5'-G GTA GGG CTC GTC GCA GCA TGT ATA AAA CTT TTC GTT GCG AAC GGC CGG GAC TTC AATGAT GAC CCA CTC CCC GC-3')

Beispiel 2

10

Expression der modifizierten Acetylcholinrezeptoren in Xenopus-Oocyten

Allgemeines

15 Um die Wirkung von Acetylcholin, Imidacloprid oder anderen potenziellen Agonisten der Acetylcholinrezeptoren auf die hergestellten modifizierten Rezeptoren zu charakterisieren, wurden elektrophysiologische Messungen an Xenopus-Oocyten durchgeführt. Die entsprechenden Methoden und Versuchsanordnungen sind in der Literatur an vielen Stellen beschrieben worden (s. z.B. Kettenmann & Grantyn, eds. 20 1992). Die Expression von klonierten oder rekombinant hergestellten Rezeptorgenen in Xenopus-Oocyten hat eine Reihe von technischen Vorteilen. Die Oocyten lassen sich durch einfache Injektion von mRNA oder cDNA zur Expression der entsprechenden Rezeptoren anregen und an diesen Zellen können die notwendigen elektrophysiologischen Messungen besonders einfach und bequem durchgeführt werden 25 (z.B. Bertrand et al. 1992, Amar et al. 1993, Cooper et al. 1996).

Expression der modifizierten Rezeptoren in Xenopus-Oocyten

Xenopus-Oocyten wurden isoliert und wie bereits beschrieben bereitgestellt 30 (Bertrand et al. 1991). Am ersten Tag nach der Isolierung der Oocyten wurden jeweils 10 nl einer Lösung mit 2 ng eines entsprechenden cDNA-Expressionsvektors

in die Zellkerne der Oocyten injiziert. Die Oocyten wurden 3 - 5 Tage bei 19°C in einem geeigneten Medium gehalten (BARTH-Lösung bestehend (in mM) aus NaCl 88, KCl 1, NaHCO₃ 2,4, MgSO₄ 0,82, Ca(NO₃)₂ 0,33, CaCl₂ 0,41, HEPES 10, pH 7,4). Nach dieser Zeit wurden die elektrophysiologischen Versuche durchgeführt.

5

Elektrophysiologische Experimente

Elektrophysiologische Aufzeichnungen wurden unter Verwendung einer Dualelektroden-Spannungsklemme nach bewährten und bekannten Methoden durchgeführt

10 (vgl. Bertrand et al. 1992). Jede Oocyte wurde einzeln in eine Messkammer platziert und mit zwei Mikroelektroden angestochen. Die Mikroelektroden sind fein ausgezogene Glaskapillaren, die mit einer geeigneten Salzlösung (z.B. 3M KCl oder 1,5M K-Acetat mit 100mM KCl) gefüllt wurden und dann einen Serienwiderstand von 0,3 - 1,2 M-Ohm aufweisen. Die Membranpotential wurde mit Hilfe des Voltage-Clamp-15 Verstärkers (TEC-00, Fa. npi, Tamm, Deutschland) auf -80mV festgesetzt und der Einwärtsstrom, der durch die Zellmembran fließt, wurde gemessen und mit einem Computer registriert. Die Messkammer wurde mit Frosch-Ringerlösung, enthaltend: 115 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂; 10 mM HEPES; bei pH 7,4 (eingestellt mit NaOH) mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 - 10 ml/Minute durchströmt. Um 20 Acetylcholin, Imidacloprid oder eine andere Wirksubstanz an diesen Oocyten zu testen, wurde die Substanz in der vorgesehenen Konzentration der Frosch-Ringer-Lösung zugesetzt und die Perfusion der Messkammer wurde kurzfristig auf diese Testlösung umgestellt. Acetylcholin (Fluka, Buchs, Schweiz) wurde als Stammlösung bei -20°C aufbewahrt und unmittelbar vor dem Experiment der Messlösung 25 zugegeben.

Alle modifizierten Rezeptoren, die auf Acetylcholin reagierten, wurden anschließend auch mit Imidacloprid getestet. Dabei ist am Auftreten eines zusätzlichen Einwärts-Stromsignals sogleich zu erkennen, ob die in der jeweiligen Oocyte ausgeprägte Rezeptorvariante von Imidacloprid aktiviert werden kann, oder nicht.

30

Um die Empfindlichkeit der modifizierten Rezeptoren auf Acetylcholin und Imidacloprid genauer zu charakterisieren, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven aufgenommen, indem das oben beschriebene Experiment mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz wiederholt wurde. Die Darstellung der relativen Signalstärken (bezogen auf die Strom-Antwort, die von einer Standarddosis Acetylcholin, hier meist 0,32 µM, ausgelöst wird) gegen die Konzentration der Testsubstanz erlaubt unmittelbar den Vergleich, welche Rezeptorvarianten gegenüber Imidacloprid besonders empfindlich sind indem erheblich geringere Konzentration an Imidacloprid erforderlich sind, um ein Stromsignal auszulösen.

10

Beispiel 3

Funktionelle Expression eines modifizierten Acetylcholinrezeptors in Sf9-Zelllinien, enthaltend die modifizierte Untereinheit gemäß SEQ ID NO: 3

15

Spodoptera frugiperda 9 (Sf9) Zellen wurden gleichzeitig mit cDNA-Expressionsplasmiden, die für die modifizierte Heliothis/Huhn-Untereinheit und für die Huhn β2-Untereinheit codieren, unter Verwendung einer liposomalen Transfektionsreagenz (DAC-30, Eurogentec, Belgien) transfiziert. 24 bis 48 Stunden nach Transfektion wurden die Ströme durch die Zellmembran der Sf9-Zellen mit Ganz-Zell-Ableitungen gemessen. Dazu wurde die Potenzialdifferenz über die Zellmembran auf -70 mV konstant gehalten. Substanzapplikationen erfolgten mittels der U-Tube-reversed flow technique (Fenwick 1982). Das Volumen der Versuchskammer, die kontinuierlich mit Badlösung perfundiert wurde (3 ml/min), betrug weniger als 0,5 ml. Die Standardperfusionslösung (extrazelluläres Medium) hatte folgende Zusammensetzung (in mM): 150 NaCl, 4 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES (pH 7,3). Die Pipettenlösung enthielt (in mM): 150 KCl, 10 HEPES 10 K-EGTA (pH 7,2). Die Mikroelektroden wurden am Elektrodenpuller (Zeitz, Deutschland) aus Borosilicatglasrohlingen (Außendurchmesser 1,6 mm, Hilgenberg, Deutschland) hergestellt. Der Widerstand der feuerpolierten Mikroelektroden lag bei Verwendung der obenannten Pipetten- und Badlösung zwischen 4 und 6 MΩ. Alle Versuche wurden bei

20

25

30

Raumtemperatur (22 - 25°C) mit einem LM-EPC7 patch-clamp-Verstärker (List electronic) durchgeführt. Die analogen Signale wurden mittels 8pole-Besselfilter auf 315 Hz gefiltert und mit 1 kHz digitalisiert. Zur Aufnahme und Analyse der Daten wurde die Software pClamp (Version 6.06) benutzt. Nach Erreichen des "giga-seals" 5 wurden die schnellen Störkapazitäten (Pipettenkapazität) mit dem C-Fast-Kompensations-modus des EPC-7 kompensiert. Es wurde keine Kompensation des Serienwiderstands (Zellkapazität) vorgenommen.

Zur Überprüfung, ob die Expression der cDNAs, die für die modifizierte Heliothis/Huhn-Untereinheit gemäß SEQ ID NO: 3 und die Huhn β 2-Untereinheit codieren, zur Produktion funktioneller Acetylcholinrezeptoren in den Zellen führte, wurde nach der oben beschriebenen Methode Ganz-Zell-Ableitungen durchgeführt und die Zellen dabei mit Acetylcholin (1000 μ M) bzw. Imidacloprid (100 μ M) stimuliert. Unmittelbar nach dem Stimulus konnten starke Einwärtsströme gemessen werden, 10 die typisch für die Aktivierung von Ionenkanälen waren und zwar sowohl bei Applikation von 1000 μ M Acetylcholin als auch bei Applikation von 100 μ M Imidacloprid (Abb. 3). Die Einwärtsströme induziert durch 100 μ M Imidacloprid waren im Mittel etwa halb so groß (0.46 ± 0.09 , n = 5 Zellen) wie die Einwärtsströme ausgelöst durch 15 1000 μ M Acetylcholin. Dagegen traten an Sf9-Zellen, die gleichzeitig mit cDNA-Expressionsplasmiden transfiziert wurden, die für die Huhn-Untereinheit α 4 und die Huhn-Untereinheit β 2 kodieren, nach Applikation von 100 μ M Imidacloprid entweder keine oder nur sehr schwache Einwärtsströme auf, die im Mittel 20mal kleiner 20 waren (0.05 ± 0.06 , n= 5 Zellen), als die Einwärtsströme verursacht durch 1000 μ M Acetylcholin.

25 Diese Ergebnisse zeigen, dass die Acetylcholinrezeptor- α -Untereinheit mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 3 zusammen mit der β 2-Untereinheit aus dem Huhn einen funktionellen Rezeptor in Sf9-Zellen bildet, der sich pharmakologisch deutlich vom rekombinant exprimierten Huhn α 4- β 2 des Huhns unterscheidet.

Beispiel 4

Nachweis der Aktivierung der zellulär exprimierten Acetylcholinrezeptoren enthaltend eine Untereinheit gemäß SEQ ID NO: 3 durch Agonisten mittels Calcium-
5 Imaging

Zellkultur und Gentransfer

SF9-Zellen wurden in einer Mischung aus $\frac{3}{4}$ TC100 Medium (Gibco, Karlsruhe, 10 Deutschland) + $\frac{1}{4}$ SF900 Medium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 10 % foetalem Kälberserum, 0,1% Pluronic (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) bei 27°C kultiviert. Für den Gentransfer wurde DAC-30 (Eurogentec) nach Angaben des Herstellers verwendet. 24 Stunden bis 48 Stunden nach dem Gentransfer wurden die Zellen in verschiedenen Dichten in Mikrotiterplatten ausgesät. Gentechnisch veränderte Zellen 15 wurden durch Wachstum in Dulbeccos Modified Eagles Medium und 10 % foetalem Kälberserum und 150 - 500 ug/ml Hygromycin während 3 bis 4 Wochen selektiert. Resistente Einzelklone wurden wie unten beschrieben analysiert.

Fura-2-Messungen

20 Die Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration wurden mit Fura-2 gemessen. Eine Stammlösung mit 2 mM Fura-2-acetoxymethylester (Sigma, München, Deutschland) in Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde auf eine Endkonzentration von 10 μ M in $\frac{3}{4}$ TC100 Medium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) + $\frac{1}{4}$ SF900 25 Medium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) mit 2% Rinderserumalbumin (Sigma, München, Deutschland) verdünnt. Die Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte in dieser Lösung 45 bis 60 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (5 mM HEPES) gepufferter Calcium-Puffer (HEPES-gepufferte Salzlösung, pH 7,2 mit 84 30 mM CaCl₂, gewaschen. 100 μ l Tyrodepuffer wurde in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und die Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axio-

vert, Zeiss, Jena, Deutschland) abwechselnd mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm bestrahlt. Eine Serie von Videobildern 120 Bilder mit einer Zeitauflösung von 250 msec wurden mit Hilfe eines TILL Imago CCD / Polychrom Bildanalyse Systems (T.I.L.L. Photonics, Martinsried, Deutschland) aufgenommen und mit Hilfe der TILLVision Software (3.3, T.I.L.L. Photonics, Martinsried, Deutschland) analysiert. Nach der Aufnahme von 30 Bildern wurden die Zellen durch Zugabe von 600 μ l 2mM Acetylcholinchlorid in Calcium-Puffer stimuliert (Endkonzentration an Acetylcholin = 1mM, Pfeil in Abbildung 4). Die Fluoreszenzintensität der Zellen bei Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 380 nm wurde durch die entsprechende Intensität bei 340 nm geteilt und so ein Verhältnis gebildet, das den relativen Anstieg der Calcium-Konzentration darstellt (Grynkiewicz et al. 1985).

Literaturverzeichnis

- 5 Amar et al. 1995, A nicotinic acetylcholine receptor subunit from insect brain forms a non-desensitizing homo-oligomeric nicotinic acetylcholine receptor when expressed in Xenopus oocytes, *Neuroscience Letters* 199, 107-110.
- Amar et al. 1993, Agonist pharmacology of the neuronal a7 nicotinic receptor expressed in Xenopus oocytes, *FEBS Lett.* 327, 284-288.
- 10 Bertrand et al. 1994, Physiological properties of neuronal nicotinic receptors reconstituted from the vertebrate beta 2 subunit and Drosophila alpha subunits, *Eur. J. Neurosci.* 6, 869-75.
- Bertrand et al. 1992, Pharmacological properties of the homomeric alpha-7 receptor, *Neurosci. Lett.* 146, 87-90.
- Bertrand et al. 1991, Methods in Neuroscience 4 , New York, Academic Press, 174-193.
- 15 Breer et al. 1987, Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors, *J. Insect Physiol.* 33, 771-790.
- Buckingham et al. 1997, Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors, *J. Exp. Biol.* 200, 2685-2692.
- 25 Buisson et al. 1996, Human α 3/ β 4 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor in HEK-293 cells: A Patch-Clamp Study, *J Neuroscience* 16, 7880-7891.
- Changeux et al. 1992, The functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis, *Quarterly Review of Biophysics* 25, 395-432.

- Claudio et al. 1983, Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Torpedo californica* acetylcholine receptor γ subunit, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1111-1115.
- 5 Cooper et al. 1996, Pharmacology of the nicotinic acetylcholine receptor from fetal rat muscle expressed in *Xenopus* oocytes, Eur. J. Pharmacol. 309, 287-298.
- Delbono et al. 1997, Activation of the Recombinant Human $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Significantly Raises Intracellular Free Calcium; J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 280, 428-438.
- 10 Devillers-Thiery et al. 1983, Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding α -subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2067-2071.
- 15 Eastham et al. 1998, Characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect *Manduca sexta*, Eur. J. Neurosci 10, 879-889.
- 20 Elgoyhen et al. 1997, US Pat. No. 5,683,912.
- Gopalakrishnan et al. 1995, Stable Expression and Pharmacological Properties of the Human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, Eur. J. Pharmacol. 290, 237-246.
- 25 Gopalakrishnan et al. 1995, Stable Expression and Pharmacological Properties of the Human Neuronal Nicotinic Acetylcholine $\alpha 4/\beta 2$ receptor, J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 276, 289-297.
- 30 Grynkiewicz et al. 1985, A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, J. Biol. Chem. 260, 3440-3450.

- Heinemann et al. 1997, US Pat. No 5,591,590.
- Hermans-Borgmeyer et al. 1986, Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from Drosophila, EMBO J. 5, 1503-1508.
- 5 Hermsen et al. 1998, Neuronal nicotinic receptors in the locust Locusta migratoria. Cloning and expression, J. Biol. Chem. 17, 18394-404.
- 10 Huang et al. 1999, Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid myzus persicae J. Neurochem. 73, 380-389.
- Jespersen et al. 1997, Efficient Non-PCR-Mediated Overlap Extension of PCR Fragments by Exonuclease „End Polishing“, Biotechniques, 23, 48.
- 15 Lansdell et al. 1997, Temperature-sensitive expression of Drosophila neuronal nicotinic acetylcholine receptors, J. Neurochem. 68, 1812-9.
- 20 Lansdell et al. 2000, The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity, Neuroparmacology 39,671-9.
- Lindstrom et al. 1997, US Pat. No. 5,599,709.
- 25 Marshall et al. 1990, Sequence and functional expression of a single α subunit of an insect nicotinic acetylcholine receptor, EMBO J. 9, 4391-4398.
- Matsuda et al. 1998, Effects of the α subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors, Br. J. Pharmacol. 123, 518-524.
- 30

Noda et al. 1982. Primary structure of α -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence, *Nature* 299, 793-797.

5 Noda et al. 1983a, Primary structures of β - and δ -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences, *Nature* 301, 251-255.

Noda et al. 1983b, Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits, *Nature* 302, 528-532.

10 Ortells et al. 1995, Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors, *Trends in Neuroscience* 18, 121-127.

15 Ragozzino et al. 1997, Functional Properties of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Channels Expressed in Transfected Human Cells, *Eur. J. Neurosci.* 9, 480-488.

Sawruk et al. 1990a, Heterogeneity of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptors: SAD, a novel developmentally regulated α -subunit. *EMBO J.* 9, 2671-2677.

20 Sawruk et al. 1990b, SBD, a novel structural subunit of the *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor, shares its genomic localization with two α -subunits, *FEBS Lett.* 273, 177-181.

25 Schloß et al. 1988, Neuronal acetylcholine receptors of *Drosophila*: the ARD protein is a component of a high-affinity α -bungarotoxin binding complex, *EMBO J.* 7, 2889-2984.

30 Schoepfer et al. 1990, Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily; *Neuron* 5, 35-48.

Schulz et al. 1998. Da α 3, a new functional α -subunit of nicotinic acetylcholine receptors from Drosophila, J. Neurochem. 71, 853-862.

5 Schulz et al. 2000, Neuronal nicotinic acetylcholine receptors from Drosophila: two different types of alpha subunits coassemble within the same receptor complex, J. Neurochem. 74, 2537-46.

10 Sgard et al. 1998, Cloning and Functional Characterization of Two Novel Nicotinic Acetylcholine Receptor α subunits from the Insect Pest *Myzus persicae*; J. Neurochem 71, 903-912.

Staudermann et al. 1998, Characterization of Human Recombinant Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 4\beta 4$ Combinations Stably Expressed in HEK-293 Cells, J. Pharmacol. Exp. Therapeutic. 284, 777-789.

15 Stetzer et al. 1996, Stable expression in HEK-293 cells of the rat $\alpha 3/\beta 4$ subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptor, FEBS Lett. 397, 39-44.

20 Thompson et al. 1997, The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, Nucleic Acids Research 24, 4876-4882.

25 Van den Beukel 1998, Species- and subtype-specific interactions of cholinesterase inhibitors with acetylcholine receptors, Dissertation Utrecht University, ISBN 90-393-1737-2.

Zhang et al. 1999, Activation and Ca $^{2+}$ Permeation of Stably Transfected $\alpha 3/\beta 4$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine receptor; Mol. Pharmacol. 55, 970-981.

Patentansprüche

1. Modifizierte Acetylcholinrezeptor-Untereinheit, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest eine Aminosäure im Bereich einer α -Untereinheit eines Vertebraten-Acetylcholinrezeptors, welcher zu der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 homolog ist, durch eine Aminosäure, die an der identischen Position in dem entsprechenden Bereich einer α -Untereinheit eines Insekten-Acetylcholinrezeptors vorkommt, ersetzt ist.
5
- 10 2. Acetylcholinrezeptor-Untereinheit gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest vier Aminosäuren der α -Untereinheit eines Vertebraten-Acetylcholinrezeptors durch die entsprechende Anzahl von Aminosäuren einer α -Untereinheit eines Insekten-Acetylcholinrezeptors ersetzt sind.
- 15 3. Acetylcholinrezeptor-Untereinheit gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zumindest sieben Aminosäuren der α -Untereinheit eines Vertebraten-Acetylcholinrezeptors durch die entsprechende Anzahl von Aminosäuren einer α -Untereinheit eines Insekten-Acetylcholinrezeptors ersetzt sind.
- 20 4. Acetylcholinrezeptor-Untereinheit gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der gesamte besagte Bereich der α -Untereinheit eines Vertebraten-Acetylcholinrezeptors durch den entsprechenden Bereich einer α -Untereinheit eines Insekten-Acetylcholinrezeptors ersetzt ist.
- 25 5. Acetylcholinrezeptor-Untereinheit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der α -Untereinheit eines Vertebraten-Acetylcholinrezeptors um neuronale Untereinheiten von Maus, Ratte, Huhn, Zebrafisch, Rhesusaffe, Rind oder Schwein handelt.
- 30 6. Acetylcholinrezeptor-Untereinheit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der α -Untereinheit eines Insekten-

Acetylcholinrezeptors um die α_2 -Untereinheit oder die α_3 -Untereinheit von *Myzus persicae*, oder um die α_1 -Untereinheit von *Heliothis virescens* oder *Manduca sexta*, oder um die α_1 -, α_2 - oder α_3 -Untereinheit von *Drosophila melanogaster* handelt.

5

7. Acetylcholinrezeptor-Untereinheit gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 3 umfasst.

8. Acetylcholinrezeptor umfassend eine Acetylcholinrezeptor-Untereinheit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.

9. Acetylcholinrezeptor gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass er zusätzlich eine β -Untereinheit von Maus, Ratte, Huhn, Zebrafisch, Rhesusaffe, Rind oder Schwein umfasst.

10. Nukleinsäure umfassend eine Nukleotidsequenz, die für eine Acetylcholinrezeptor-Untereinheit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 codiert.

11. Nukleinsäure gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einzelsträngige oder doppelsträngige DNA oder RNA handelt.

12. Nukleinsäure gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Fragmente genomischer DNA oder cDNA handelt.

13. Nukleinsäure gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleotidsequenz der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 entspricht.

14. DNA-Konstrukt umfassend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13 und einen heterologen Promotor.

30

15. Vektor umfassend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13 oder ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 14.
16. Vektor gemäß nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.
17. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 14 oder einen Vektor gemäß Anspruch 15 oder 16.
18. Wirtszelle gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine prokaryotische Zelle, insbesondere um E. coli, handelt.
19. Wirtszelle gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine eukaryotische Zelle, insbesondere um eine Säuger- oder Insektenzelle, handelt.
20. Verfahren zum Herstellen einer Acetylcholinrezeptor-Untereinheit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, umfassend
 - a) das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19 unter Bedingungen, die die Expression der Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13 gewährleisten, oder
 - b) das Exprimieren einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13 in einem in vitro-System, und
 - (c) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle, dem Kulturmedium oder dem in vitro-System.

21. Verfahren zum Herstellen einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, umfassend die folgenden Schritte:

- (a) Vollständige chemische Synthese auf an sich bekannte Weise, oder
5
(b) chemische Synthese von Oligonukleotiden und Amplifizierung der besagten Nukleinsäure mittels PCR.

22. Verfahren zum Auffinden von Wirkstoffen für den Pflanzenschutz oder von pharmazeutischen Wirkstoffen für die Behandlung von Mensch oder Tier umfassend die folgenden Schritte:

- 10
(a) Bereitstellen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 17,
15
(b) Kultivieren der Wirtszelle in der Gegenwart einer oder mehrerer chemischen Verbindungen, und
(c) Detektieren veränderter Leitungseigenschaften der Acetylcholinrezeptoren.

- 20
25
23. Verwendung einer Acetylcholinrezeptor-Untereinheit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, eines Acetylcholinrezeptors gemäß Anspruch 8 oder 9, einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, eines DNA-Konstrukts gemäß Anspruch 14, eines Vektors gemäß Anspruch 15 oder 16, oder einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19 zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz oder von pharmazeutischen Wirkstoffen für die Behandlung von Mensch oder Tier.

Modifizierte Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Erfindung betrifft modifizierte Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten, dafür codierende Nukleinsäuren, sowie ein Verfahren zum Auffinden von Wirkstoffen für den Pflanzenschutz bzw. pharmazeutischen Wirkstoffen für die Behandlung von Mensch und/oder Tier.

Abbildung 1

Sequenzvergleich im Bereich der ligandenbindenden Domäne der α -Untereinheiten nikotinischer Acetylcholinrezeptoren

Accession Numbers der verwendeten α -Untereinheiten:

```
>gi 871037 : a4_chick
>gi|213218 : a1_Torpedo
>S77094 : a1_Human
>P17644 : a2_Drosophila
>CAA75688 : a3_Drosophila
>CAA04056 : a1_Heliothis
>AAD09808 : a2_Heliothis
>AAD09809 : a3_Heliothis
>CAA57477 : a2_Myzus
>AJ236786 : a3_Myzus
```

Parameter von ClustalX 1.81(Thompson et al. 1997, IGBMC, Straßburg, Frankreich)

```
-type=protein \
-pwmatrix=gonnet \
-pwgapopen=10.00 \
-pwgapext=0.10 \
-matrix=gonnet \
-gapopen=10.00 \
-gapext=0.20 \
-maxdiv=30 \
-endgaps \
-novgap \
-hgapresidues=GPSNDQEKR \
-gapdist=4 \
```

a3_Heliothis	YDDLLSNYNR	LIRPVTVNVSD	ILTVRLGLKL	SQLMEVNLKN	QVMTTNLWVE
a2_Myzus	YDDLLSNYNR	LIRPVGNNSD	RLTVKMGGLKL	SQIIEVNLRN	QIMTTNVWVE
a2_Drosophila	YDDLLSNYNR	LIRPVSNNTD	TVLVKLGLRL	SQLIDLNLKQ	QILTTNVWLE
a1_Manduca	YDDLLSNYNK	LVRPVLVNVSD	ALTVRIKLKL	SQLIDVNLKN	QIMTTNLWVE
a1_Heliothis	YDDLLSNYNK	LVRPVLVNVSD	ALTVRIKLKL	SQLIDVNLKN	QIMTTNLWVE
a3_Drosophila	YDDLLSNYNK	LVRPVVNVTD	ALTVRIKLKL	SQLIDVNLKN	QIMTTNLWVE
a3_Myzus	YDDLLSNYNK	LVRPVLNNTD	PLPVRIKLKL	SQLIDINLKN	QIMTTNLWVE
a1_Torpedo	VANLLENYNK	VIRPVEHHHTH	FVDITVGLQL	IQLISVDEVN	QIVETNVRLR
a1_Human	VAKLFKDYSS	VVRPVEDHRQ	VVEVTVGLQL	IQLINVDEVN	QIVTTNVRLK
a4_Chick	LKKLFSGYNK	WSRPVANISD	VVLVRFGLSI	AQLIDVDEKN	QMMTTNVWVK

a3_Heliothis	Q.....	KWFD	YKLQWNPDDY	GGVEMLYVPS
a2_Myzus	Q.....	EWND	YKLKWNPDNEY	GGVDTLHVPS
a2_Drosophila	H.....	EWQD	HFKFWNDPSEY	GGVTTELYVPS
a1_Manduca	Q.....	SWYD	YKLSWEPREY	GGVEMLHVPS
a1_Heliothis	Q.....	SWYD	YKLSWEPREY	GGVEMLHVPS
a3_Drosophila	Q.....	SWYD	YKLKWEPEKEY	GGVEMLHVPS
a3_Myzus	Q.....	YWYD	YKLTKWNPDNEY	GGVEGLHVPS
a1_Torpedo	Q.....	QWID	VPLFKNIPADY	GGIKKIRLPS
a1_Human	QGDMVDLPRP	SCVTLGVPFLF	SHLQNQEOWVD	YNLKWNPDDY
a4_Chick	Q.....	EWHD	YKLRLWDPOEY	ENVTSIIPS

a3_Heliophis	EHIWLPDIVL	YNNWDGNYEV	TLMTKATLKY	TGEVNWKPAA	IYKSSCEINV
a2_Myzus	EHIWLPDIVL	YNNADGNYEV	TIMTKAILHY	TGKVVWKPPA	IYKSFCEINV
a2_Drosophila	EHIWLPDIVL	YNNADGEYVV	TTMTKAILHY	TGKVVWTTPA	IFKSSCIEDV
a1_Manduca	DHIWRPDIVL	YNNADGNFEV	TLATKATLNY	TGRVEWRPPA	IYKSSCIEDV
a1_Heliophis	DHIWRPDIVL	YNNADGNFEV	TLATKATLNY	TGRVEWRPPA	IYKSSCIEDV
a3_Drosophila	DHIWRPDIVL	YNNADGNFEV	TLATKATLNY	TGRVEWRPPA	IYKSSCIEDV
a3_Myzus	EHVWRPDIVL	YNNADGNFEV	TLATKAMLYH	SGRVEWKPPA	IYKSSCIEDV
a1_Torpedo	DDVWLPLDLVL	YNNADGDFAI	VHMTKLLLDY	TGKIMNTTPA	IFKSYCEIIV
a1_Human	EKIWRPDLVL	YNNADGDFAI	VKFTKVLLQY	TGHITWTTPA	IFKSYCEIIV
a4_Chick	ELIWRPDIVL	YNNADGDFAV	THLTKAHLFY	DGRIKWMPPA	IYKSSCSIDV

a3_Heliophis	EYFPFDEQTC	FMKFGSWTYN	GAQVDLKHM	QSPGSS.LVH	VGIDLSEFYL
a2_Myzus	EYFPFDEQTC	SMKFGSWTYD	GYMMDLRHIS	QAPDSD.VIE	VGIDLQDYYL
a2_Drosophila	RYFPFDQQTC	FMKFGSWTYD	GQDQIDLKHS	QKNDKDNKVE	IGIDLREYYP
a1_Manduca	EYFPFDQQTC	VMKFGSWTYD	GFQVQLRHID	EVRGTN.VVE	LGVSDLSEFYT
a1_Heliophis	<u>EYFPFDQQTC</u>	<u>VMKFGSWTYD</u>	<u>GFQVQLRHID</u>	<u>EAPGTN.VVE</u>	<u>LGVSDLSEFYT</u>
a3_Drosophila	EYFPFDEQTC	VMKFGSWTYD	GFQVQLRHID	ELNGTN.VVE	VGVSDLSEFYT
a3_Myzus	EFFPFDEQTC	VMKFGSWTYD	GFQVQLRHAN	EVSGSR.VVD	VGVSDLSEFYA
a1_Torpedo	THFPFDQQNC	TMKLGWIWTYD	GTKVSISPES	DR.....	.PDLSTFME
a1_Human	THFPFDEQNC	SMKLGWTYD	GSVVAINPES	DQ.....	.PDLSNFME
a4_Chick	TFFPFDQQNC	KMKFGSWTYD	KAKIDLVSMH	SH.....	.VDOLDYWME

a3_Heliophis	SVEWDILEVP	ATRNEEYYP	CPEP.FSDIT	FKLTMRRKTL	FYTVNLIIPC
a2_Myzus	SVEWDIMGVP	AVRHEKFYVC	CEEP.YLDIF	FNITLRRKTL	FYTVNLIIPC
a2_Drosophila	SVEWDILGVP	AERHEKYYP	CAEP.YPDIF	FNITLRRKTL	FYTVNLIIPC
a1_Manduca	SVEWDILEVP	AVRNEKFYTC	CDEP.YLDIT	FNITMRRKTL	FYTVNLIIPC
a1_Heliophis	SVEWDILEVP	AVRNEKFYTC	CDEP.YLDIT	FNITMRRKTL	FYTVNLIIPC
a3_Drosophila	SVEWDILEVP	AVRNEKFYTC	CDEP.YLDIT	FNITMRRKTL	FYTVNLIIPC
a3_Myzus	SVEWDILEVP	AIRNEKYYT	CEEP.YLDIT	FNITMRRKTL	FYTVNLIIPC
a1_Torpedo	SGEWVMKDYR	GWKHWVYYTC	CPDTPYLDIT	YHFIMQRIPL	YFVVNVIIIPC
a1_Human	SGEWVIKESR	GWKHSVTYSC	CPDTPYLDIT	YHFVMQRLPL	YFIVNVIIPC
a4_Chick	SGEWVIINAV	GNYNSKKYEC	CTEI.YPDIT	YSFIIPRLPL	FYTINLIIPC

Abbildung 2

2A) Rezeptor enthaltend Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 3 und Huhn $\beta 2$

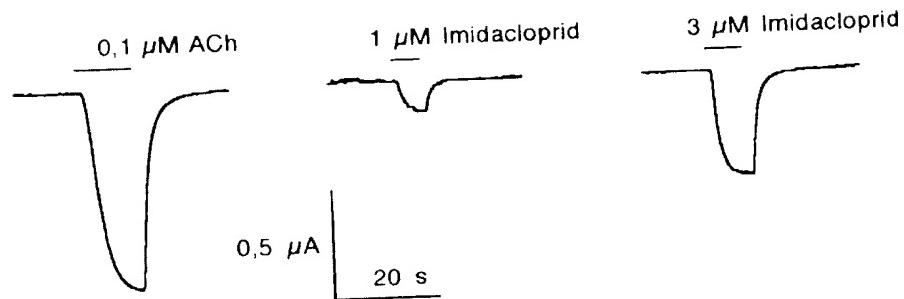
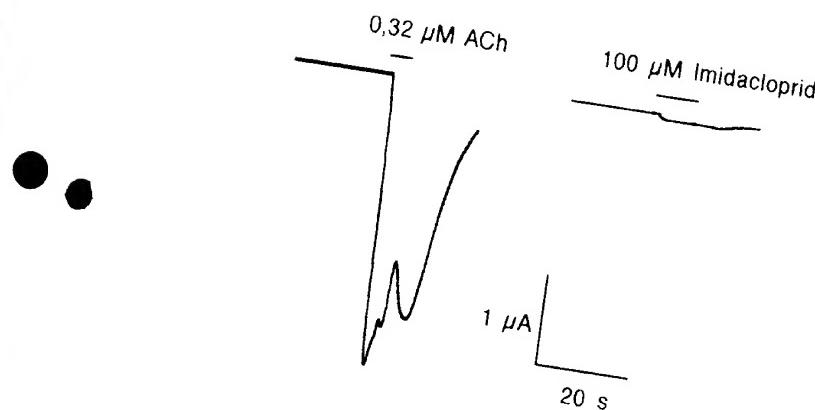


Abbildung 2 (Fortsetzung)

2B) Rezeptor enthaltend Huhn $\alpha 4$ und Huhn $\beta 2$



2C) Rezeptor enthaltend Heliothis $\alpha 1$ und Huhn $\beta 2$

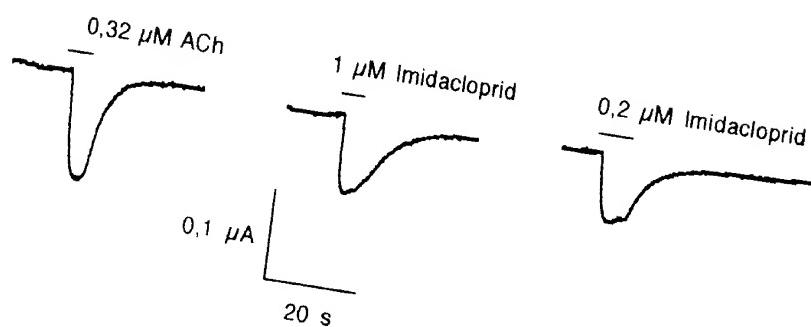
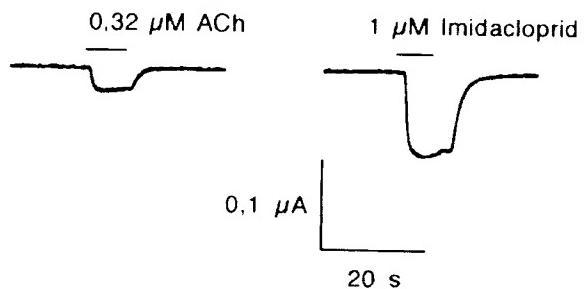
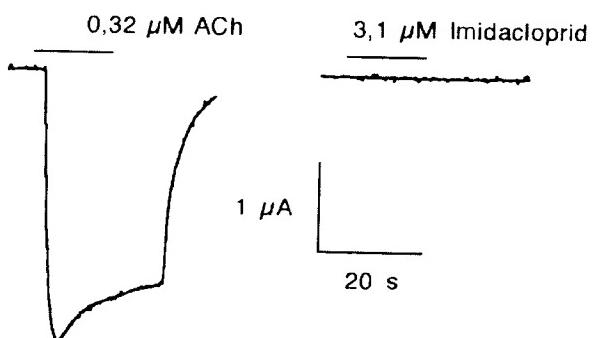


Abbildung 2 (Fortsetzung)

2D) Rezeptor enthaltend Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 7 und Huhn $\beta 2$



2E) Rezeptor enthaltend Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 11 und Huhn $\beta 2$



2F) Rezeptor enthaltend Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 15 und Huhn $\beta 2$

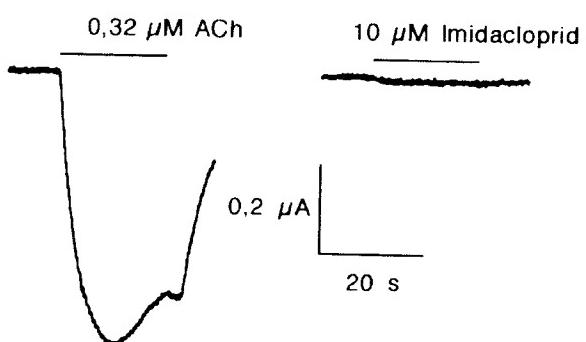
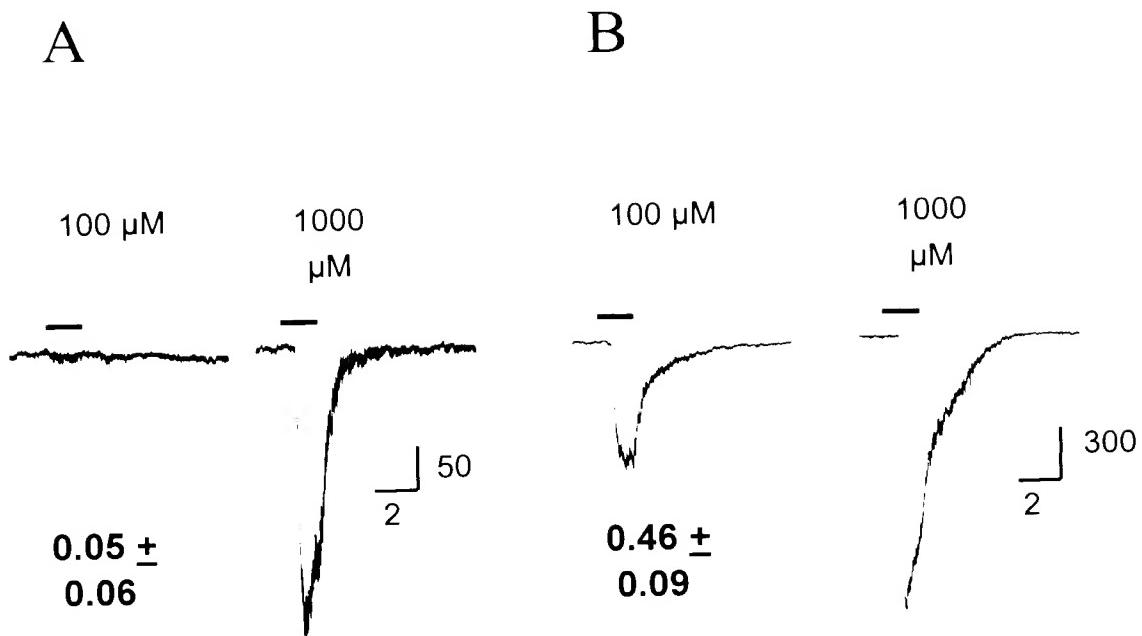


Abbildung 3

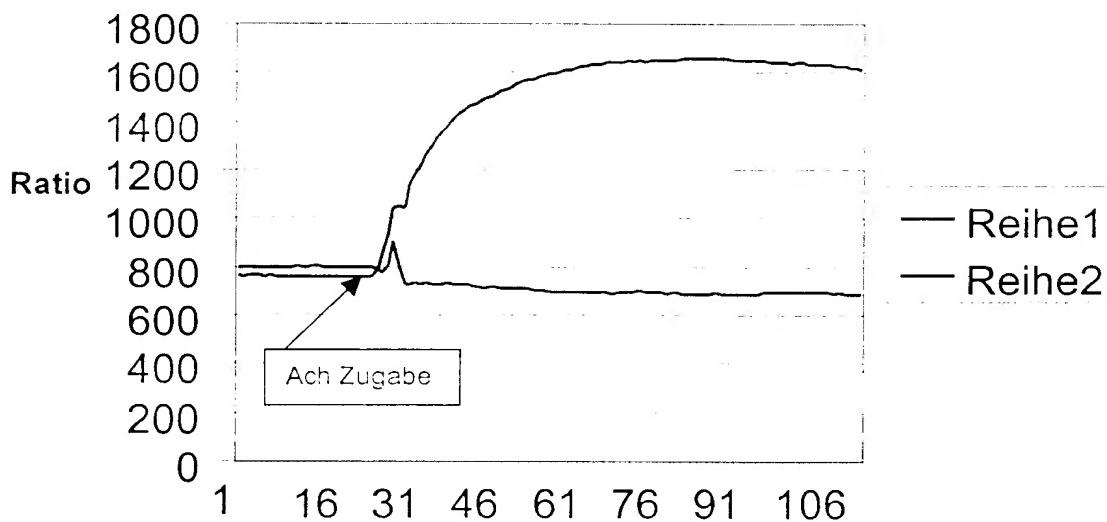


A: Rezeptor enthaltend Huhn α -4 und Huhn β -2 exprimiert in SF-9 Zellen

B: Rezeptor enthaltend Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 3 und Huhn β -2 exprimiert in SF-9 Zellen

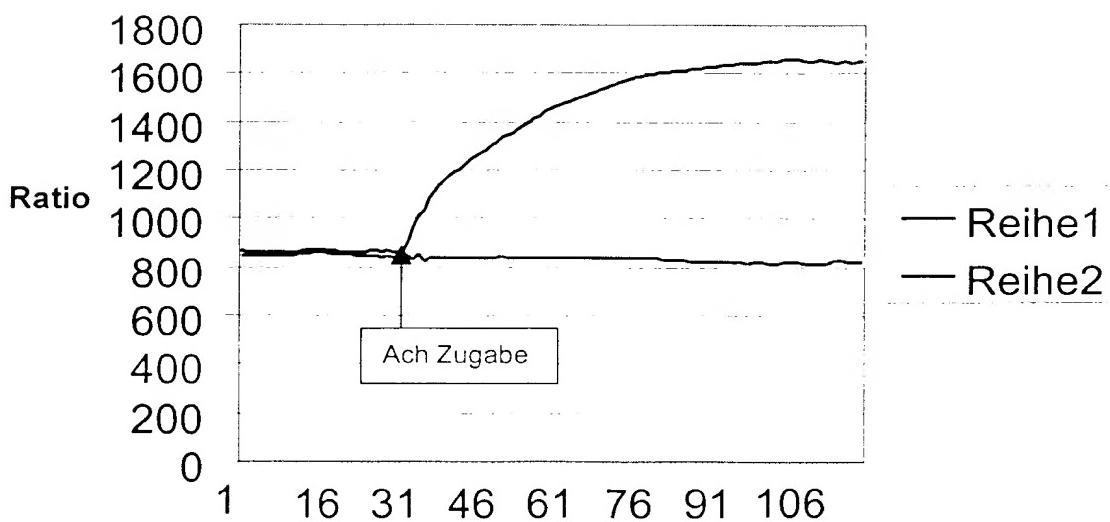
Abbildung 4

SEQ ID NO: 3 + Huhn β -2



Messpunkt

Huhn α 4/ β 2



Messpunkt

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bayer Aktiengesellschaft

<120> Modifizierte Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten

<130> Le A 34 821

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

<211> 45

<212> PRT

<213> Torpedo californica

<400> 1

Asp Phe Ala Ile Val His Met Thr Lys Leu Leu Leu Asp Tyr Thr Gly

15

5

10

Lys Ile Met Trp Thr Pro Pro Ala Ile Phe Lys Ser Tyr Cys Glu Ile

30

1

25

20

40

35

45

Ile Val Thr His Phe Pro Phe Asp Gln Gln Asn Cys Thr

35

Ile Val Thr His Phe Pro Phe Asp Gln Gln Asn Cys Thr

<210> 2

<211> 1869

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1866)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifizierte
alpha 4-Untereinheit des nikotinischen
Acetylcholinrezeptors des Huhns

<400> 2

atg gga ttt ctc gtg tcg aag gga aac ctc ctc ctg ctg tgt gcc 48

Met	Gly	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Ala		
1		5							10					15		
agc	atc	tcc	ccc	gct	tcc	ggc	cac	gtg	gaa	acg	cga	gcc	cat	gcg	gag	96
Ser	Ile	Phe	Pro	Ala	Phe	Gly	His	Val	Glu	Thr	Arg	Ala	His	Ala	Glu	
		20						25					30			
gag	cgc	ctc	ctg	aag	aaa	ctc	tcc	ggg	tat	aac	aag	tgg	tcc	cgt	144	
Glu	Arg	Leu	Leu	Lys	Lys	Leu	Phe	Ser	Gly	Tyr	Asn	Lys	Trp	Ser	Arg	
		35					40				45					
ccc	gtc	gcc	aac	att	tcg	gat	gtg	gtc	ctg	gtc	cgc	tcc	ggc	ttg	tcc	192
Pro	Val	Ala	Asn	Ile	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Val	Arg	Phe	Gly	Leu	Ser	
		50				55			60							
ata	gcc	cag	ctc	atc	gat	gtt	gat	gag	aag	aac	caa	atg	atg	acc	aca	240
Ile	Ala	Gln	Leu	Ile	Asp	Val	Asp	Glu	Lys	Asn	Gln	Met	Met	Thr	Thr	
		65			70				75			80				
aat	gtg	tgg	gtg	aag	cag	gag	tgg	cac	gac	tac	aag	ctg	cgc	tgg	gac	288
Asn	Val	Trp	Val	Lys	Gln	Glu	Trp	His	Asp	Tyr	Lys	Leu	Arg	Trp	Asp	
		85				90				95						
ccc	cag	gag	tat	gaa	aac	gtc	aca	tcc	atc	cga	atc	ccc	tca	gag	ctc	336
Pro	Gln	Glu	Tyr	Glu	Asn	Val	Thr	Ser	Ile	Arg	Ile	Pro	Ser	Glu	Leu	
		100				105				110						
atc	tgg	cg	ccg	gac	ata	gtc	ctc	tac	aac	aat	gcc	gac	ggc	aac	ttc	384
Ile	Trp	Arg	Pro	Asp	Ile	Val	Leu	Tyr	Asn	Asn	Ala	Asp	Gly	Asn	Phe	
		115				120				125						
gag	gta	acg	ctg	g	acg	aag	g	cg	act	ttg	aat	tat	acg	g	gtg	432
Glu	Val	Thr	Leu	Ala	Thr	Lys	Ala	Thr	Leu	Asn	Tyr	Thr	Gly	Arg	Val	
		130				135			140							
gag	tgg	cgc	ccg	ccg	gct	atc	tac	aag	tcc	tcg	tgc	gag	atc	gac	gtg	480
Glu	Trp	Arg	Pro	Pro	Ala	Ile	Tyr	Lys	Ser	Ser	Cys	Glu	Ile	Asp	Val	
		145				150			155			160				
gaa	tac	ttc	ccg	ttc	gac	cag	cag	acg	tgc	gtc	atg	aag	ttc	ggc	tcg	528
Glu	Tyr	Phe	Pro	Phe	Asp	Gln	Gln	Thr	Cys	Val	Met	Lys	Phe	Gly	Ser	
			165				170				175					
tgg	aca	tat	gac	aaa	gct	aag	ata	gac	ttg	gtg	acg	atg	cat	acg	cat	576
Trp	Thr	Tyr	Asp	Lys	Ala	Lys	Ile	Asp	Leu	Val	Ser	Met	His	Ser	His	
		180					185			190						
gtg	gac	caa	ctg	gac	tac	tgg	gaa	agc	ggg	gag	tgg	gtc	atc	att	aat	624

Val Asp Gln Leu Asp Tyr Trp Glu Ser Gly Glu Trp Val Ile Ile Asn		
195	200	205
gcc gtg ggc aat tac aac aac agc aag aaa tat gaa tgc tgc aca gag atc	672	
Ala Val Gly Asn Tyr Asn Ser Lys Lys Tyr Glu Cys Cys Thr Glu Ile		
210	215	220
tac cct gat ata act tac tcc ttc att atc cgg agg ctg ccg ctg ttc	720	
Tyr Pro Asp Ile Thr Tyr Ser Phe Ile Ile Arg Arg Leu Pro Leu Phe		
225	230	235
tac aca atc aat ttg atc att ccc tgc ctg ctt atc tcc tgc ttg act	768	
Tyr Thr Ile Asn Leu Ile Ile Pro Cys Leu Leu Ile Ser Cys Leu Thr		
245	250	255
gtc ctg gtc ttc tac cta ccc tct gag tgc gga gag aag ata acc ttg	816	
Val Leu Val Phe Tyr Leu Pro Ser Glu Cys Gly Glu Lys Ile Thr Leu		
260	265	270
tgc atc tct gtg ctg cta tcc ctc acg gtg ttc ctg ctc atc aca	864	
Cys Ile Ser Val Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Leu Ile Thr		
275	280	285
gag atc atc cct tct acc tcc ctg gtc atc ccc ctg ata gga gag tat	912	
Glu Ile Ile Pro Ser Thr Ser Leu Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Tyr		
290	295	300
ctg ctc ttc acc atg ata ttt gtc acc ttg tct atc atc atc act gtc	960	
Leu Leu Phe Thr Met Ile Phe Val Thr Leu Ser Ile Ile Ile Thr Val		
305	310	315
ttt gtg ctc aac gta cac cac cgt tca cca cgt acc cac acg atg cct	1008	
Phe Val Leu Asn Val His His Arg Ser Pro Arg Thr His Thr Met Pro		
325	330	335
gac tgg gtg agg agg gtc ttc ctt gac ata gtc cca cgt ctc ctc ttc	1056	
Asp Trp Val Arg Arg Val Phe Leu Asp Ile Val Pro Arg Leu Leu Phe		
340	345	350
atg aag cgg ccc tcc aca gtg aaa gac aat tgc aag aag ctt att gaa	1104	
Met Lys Arg Pro Ser Thr Val Lys Asp Asn Cys Lys Lys Leu Ile Glu		
355	360	365
tct atg cac aaa cta acc aac tca cca agg ctt tgg tct gag acc gac	1152	
Ser Met His Lys Leu Thr Asn Ser Pro Arg Leu Trp Ser Glu Thr Asp		
370	375	380
atg gag ccc aac ttc act acc tca tcc tcc ccc agc ccc cag agt aat	1200	
atg gag ccc aac ttc act acc tca tcc tcc ccc agc ccc cag agt aat		

Asp Ala Asp Phe Ser Val Lys Glu Asp Trp Lys Tyr Val Ala Met Val
 580 585 590
 att gac cgg atc ttt ctc tgg atg ttc atc atc gtg tgt ttg ctg ggg 1824
 Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp Met Phe Ile Ile Val Cys Leu Leu Gly
 595 600 605
 acc gtt ggg ctc ttc ctc ccg tgg ctg gca gga atg atc taa 1869
 Thr Val Gly Leu Phe Leu Pro Pro Trp Leu Ala Gly Met Ile
 610 615 620

 <210> 3
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifizierte
 alpha 4-Untereinheit des nikotinischen
 Acetylcholinrezeptors des Huhns

<400> 3
 Met Gly Phe Leu Val Ser Lys Gly Asn Leu Leu Leu Leu Cys Ala
 1 5 10 15
 Ser Ile Phe Pro Ala Phe Gly His Val Glu Thr Arg Ala His Ala Glu
 20 25 30
 Glu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Phe Ser Gly Tyr Asn Lys Trp Ser Arg
 35 40 45
 Pro Val Ala Asn Ile Ser Asp Val Val Leu Val Arg Phe Gly Leu Ser
 50 55 60
 Ile Ala Gln Leu Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Met Met Thr Thr
 65 70 75 80
 Asn Val Trp Val Lys Gln Glu Trp His Asp Tyr Lys Leu Arg Trp Asp
 85 90 95
 Pro Gln Glu Tyr Glu Asn Val Thr Ser Ile Arg Ile Pro Ser Glu Leu
 100 105 110
 Ile Trp Arg Pro Asp Ile Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Asn Phe
 115 120 125
 Glu Val Thr Leu Ala Thr Lys Ala Thr Leu Asn Tyr Thr Gly Arg Val
 130 135 140

Glu Trp Arg Pro Pro Ala Ile Tyr Lys Ser Ser Cys Glu Ile Asp Val
 145 150 155 160
 Glu Tyr Phe Pro Phe Asp Gln Gln Thr Cys Val Met Lys Phe Gly Ser
 165 170 175
 Trp Thr Tyr Asp Lys Ala Lys Ile Asp Leu Val Ser Met His Ser His
 180 185 190
 Val Asp Gln Leu Asp Tyr Trp Glu Ser Gly Glu Trp Val Ile Ile Asn
 195 200 205
 Ala Val Gly Asn Tyr Asn Ser Lys Lys Tyr Glu Cys Cys Thr Glu Ile
 210 215 220
 Tyr Pro Asp Ile Thr Tyr Ser Phe Ile Arg Arg Leu Pro Leu Phe
 225 230 235 240
 Tyr Thr Ile Asn Leu Ile Ile Pro Cys Leu Leu Ile Ser Cys Leu Thr
 245 250 255
 Val Leu Val Phe Tyr Leu Pro Ser Glu Cys Gly Glu Lys Ile Thr Leu
 260 265 270
 Cys Ile Ser Val Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Leu Ile Thr
 275 280 285
 Glu Ile Ile Pro Ser Thr Ser Leu Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Tyr
 290 295 300
 Leu Leu Phe Thr Met Ile Phe Val Thr Leu Ser Ile Ile Ile Thr Val
 305 310 315 320
 Phe Val Leu Asn Val His His Arg Ser Pro Arg Thr His Thr Met Pro
 325 330 335
 Asp Trp Val Arg Arg Val Phe Leu Asp Ile Val Pro Arg Leu Leu Phe
 340 345 350
 Met Lys Arg Pro Ser Thr Val Lys Asp Asn Cys Lys Lys Leu Ile Glu
 355 360 365
 Ser Met His Lys Leu Thr Asn Ser Pro Arg Leu Trp Ser Glu Thr Asp
 370 375 380
 Met Glu Pro Asn Phe Thr Thr Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gln Ser Asn
 385 390 395 400

Glu Pro Ser Pro Thr Ser Ser Phe Cys Ala His Leu Glu Glu Pro Ala
 405 410 415
 Lys Pro Met Cys Lys Ser Pro Ser Gly Gln Tyr Ser Met Leu His Pro
 420 425 430
 Glu Pro Pro Gln Val Thr Cys Ser Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Pro
 435 440 445
 Leu Ser Asp Thr Gln Thr Thr Ser Ile Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ser
 450 455 460
 Val Gln Gln Met Tyr Ser Pro Asn Lys Thr Glu Glu Gly Ser Ile Arg
 465 470 475 480
 Cys Arg Ser Arg Ser Ile Gln Tyr Cys Tyr Leu Gln Glu Asp Ser Ser
 485 490 495
 Gln Thr Asn Gly His Ser Ser Ala Ser Pro Ala Ser Gln Arg Cys His
 500 505 510
 Leu Asn Glu Glu Gln Pro Gln His Lys Pro His Gln Cys Lys Cys Lys
 515 520 525
 Cys Arg Lys Gly Glu Ala Ala Gly Thr Pro Thr Gln Gly Ser Lys Ser
 530 535 540
 His Ser Asn Lys Gly Glu His Leu Val Leu Met Ser Pro Ala Leu Lys
 545 550 555 560
 Leu Ala Val Glu Gly Val His Tyr Ile Ala Asp His Leu Arg Ala Glu
 565 570 575
 Asp Ala Asp Phe Ser Val Lys Glu Asp Trp Lys Tyr Val Ala Met Val
 580 585 590
 Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp Met Phe Ile Ile Val Cys Leu Leu Gly
 595 600 605
 Thr Val Gly Leu Phe Leu Pro Pro Trp Leu Ala Gly Met Ile
 610 615 620

<210> 4
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 4
 cacgtgcctt ccgagtcat ctggcgccg g 31

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 5
 gtcatatgtc cacgagccga ac 22

<210> 6
 <211> 1896
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1893)

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifizierte
 alpha 4-Untereinheit des nikotinischen
 Acetylcholinrezeptors des Huhns

<400> 6
 atg gga ttt ctc gtg tcg aag gga aac ctc ctc ctc ctg ctg tgt gcc 48
 Met Gly Phe Leu Val Ser Lys Gly Asn Leu Leu Leu Leu Cys Ala
 1 5 10 15

agc atc ttc ccc gct ttc ggc cac gtg gaa acg cga gcc cat gcg gag 96
 Ser Ile Phe Pro Ala Phe Gly His Val Glu Thr Arg Ala His Ala Glu
 20 25 30

gag cgc ctc ctg aag aaa ctc ttc tcc ggg tat aac aag tgg tcc cgt 144
 Glu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Phe Ser Gly Tyr Asn Lys Trp Ser Arg
 35 40 45

ccc gtc gcc aac att tcg gat gtg gtc ctg gtc cgc ttc ggc ttg tcc 192

Pro Val Ala Asn Ile Ser Asp Val Val Leu Val Arg Phe Gly Leu Ser			
50	55	60	
ata gcc cag ctc atc gat gtt gat gag aag aac caa atg atg acc aca			240
Ile Ala Gln Leu Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Met Met Thr Thr			
65	70	75	80
aat gtg tgg gtg aag cag gag tgg cac gac tac aag ctg cgc tgg gac			288
Asn Val Trp Val Lys Gln Glu Trp His Asp Tyr Lys Leu Arg Trp Asp			
85	90	95	
ccc cag gag tat gaa aac gtc aca tcc atc cga atc ccc tca gag ctc			336
Pro Gln Glu Tyr Glu Asn Val Thr Ser Ile Arg Ile Pro Ser Glu Leu			
100	105	110	
atc tgg cgg ccg gac ata gtc ctc tac aac aat gcc gac ggc aac ttc			384
Ile Trp Arg Pro Asp Ile Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Asn Phe			
115	120	125	
gag gta acg ctg gcg acg aag gcg act ttg aat tat acg gga cgt gtg			432
Glu Val Thr Leu Ala Thr Lys Ala Thr Leu Asn Tyr Thr Gly Arg Val			
130	135	140	
gag tgg cgc ccg ccg gct atc tac aag tcc tcg tgc gag atc gac gtg			480
Glu Trp Arg Pro Pro Ala Ile Tyr Lys Ser Ser Cys Glu Ile Asp Val			
145	150	155	160
gaa tac ttc ccg ttc gac cag cag acg tgc gtc atg aag ttc ggc tcg			528
Glu Tyr Phe Pro Phe Asp Gln Gln Thr Cys Val Met Lys Phe Gly Ser			
165	170	175	
tgg aca tac gac ggc ttc cag gtg gac ctg cgg cac atc gac gag gcg			576
Trp Thr Tyr Asp Gly Phe Gln Val Asp Leu Arg His Ile Asp Glu Ala			
180	185	190	
cgc ggg acc aac gtg gtg gag ctg ggc gtc gac ctg tcc gag ttc tac			624
Arg Gly Thr Asn Val Val Glu Leu Gly Val Asp Leu Ser Glu Phe Tyr			
195	200	205	
acc tcc gtg gag tgg gac atc ctg gag gtg cca gcc gtc agg aac gag			672
Thr Ser Val Glu Trp Asp Ile Leu Glu Val Pro Ala Val Arg Asn Glu			
210	215	220	
aag ttc tac acg tgc tgc gac gag atc tac cct gat ata act tac tcc			720
Lys Phe Tyr Thr Cys Cys Asp Glu Ile Tyr Pro Asp Ile Thr Tyr Ser			
225	230	235	240
ttc att atc cgg agg ctg ccg ctg ttc tac aca atc aat ttg atc att			768

Phe Ile Ile Arg Arg Leu Pro Leu Phe Tyr Thr Ile Asn Leu Ile Ile			
245	250	255	
ccc tgc ctg ctt atc tcc tgc ttg act gtc ctg gtc ttc tac cta ccc			816
Pro Cys Leu Leu Ile Ser Cys Leu Thr Val Leu Val Phe Tyr Leu Pro			
260	265	270	
tct gag tgc gga gag aag ata acc ttg tgc atc tct gtg ctg cta tcc			864
Ser Glu Cys Gly Glu Lys Ile Thr Leu Cys Ile Ser Val Leu Leu Ser			
275	280	285	
ctc acg gtg ttc ctg ctg ctc atc aca gag atc atc cct tct acc tcc			912
Leu Thr Val Phe Leu Leu Ile Thr Glu Ile Ile Pro Ser Thr Ser			
290	295	300	
ctg gtc atc ccc ctg ata gga gag tat ctg ctc ttc acc atg ata ttt			960
Leu Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Leu Phe Thr Met Ile Phe			
305	310	315	320
gtc acc ttg tct atc atc act gtc ttt gtg ctc aac gta cac cac			1008
Val Thr Leu Ser Ile Ile Thr Val Phe Val Leu Asn Val His His			
325	330	335	
cgt tca cca cgt acc cac acg atg cct gac tgg gtg agg agg gtc ttc			1056
Arg Ser Pro Arg Thr His Thr Met Pro Asp Trp Val Arg Arg Val Phe			
340	345	350	
ctt gac ata gtc cca cgt ctc ctc ttc atg aag cgg ccc tcc aca gtg			1104
Leu Asp Ile Val Pro Arg Leu Leu Phe Met Lys Arg Pro Ser Thr Val			
355	360	365	
aaa gac aat tgc aag aag ctt att gaa tct atg cac aaa cta acc aac			1152
Lys Asp Asn Cys Lys Lys Leu Ile Glu Ser Met His Lys Leu Thr Asn			
370	375	380	
tca cca agg ctt tgg tct gag acc gac atg gag ccc aac ttc act acc			1200
Ser Pro Arg Leu Trp Ser Glu Thr Asp Met Glu Pro Asn Phe Thr Thr			
385	390	395	400
tca tcc tcc ccc agc ccc cag agt aat gaa cct tca ccc aca tct tcc			1248
Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gln Ser Asn Glu Pro Ser Pro Thr Ser Ser			
405	410	415	
ttc tgt gcc cac ctt gag gag cca gcc aaa cct atg tgc aaa tcc cct			1296
Phe Cys Ala His Leu Glu Glu Pro Ala Lys Pro Met Cys Lys Ser Pro			
420	425	430	
tct gga cag tac tca atg ctg cac cct gag ccc cca cag gtg acg tgt			1344

Ser Gly Gln Tyr Ser Met Leu His Pro Glu Pro Pro Gln Val Thr Cys
 435 440 445
 tcc tct ccg aag ccc tcc tgc cac ccc ctg agt gac acc cag acc aca 1392
 Ser Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Pro Leu Ser Asp Thr Gln Thr Thr
 450 455 460
 tct atc tca aaa ggc aga tcg ctc agt gtt cag cag atg tac agc ccc 1440
 Ser Ile Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ser Val Gln Gln Met Tyr Ser Pro
 465 470 475 480
 aat aag aca gag gaa ggg agc atc cgc tgt agg tcc cga agc atc cag 1488
 Asn Lys Thr Glu Glu Gly Ser Ile Arg Cys Arg Ser Arg Ser Ile Gln
 485 490 495
 tac tgt tac ctg cag gag gac tct tcc cag acc aat ggc cac tct agt 1536
 Tyr Cys Tyr Leu Gln Glu Asp Ser Ser Gln Thr Asn Gly His Ser Ser
 500 505 510
 gcc tct cca gcg tcg cag cgc tgc cac ctc aat gaa gag cag ccc cag 1584
 Ala Ser Pro Ala Ser Gln Arg Cys His Leu Asn Glu Glu Gln Pro Gln
 515 520 525
 cac aag ccc cac cag tgc aag tgt aag tgc aga aag gga gag gca gct 1632
 His Lys Pro His Gln Cys Lys Cys Lys Cys Arg Lys Gly Glu Ala Ala
 530 535 540
 ggc aca ccg act caa gga agc aag agc cac agc aac aaa gga gaa cac 1680
 Gly Thr Pro Thr Gln Gly Ser Lys Ser His Ser Asn Lys Gly Glu His
 545 550 555 560
 ctc gtg ctg atg tcc cca gcc ctg aag ctg gcg gtg gaa ggg gtc cac 1728
 Leu Val Leu Met Ser Pro Ala Leu Lys Leu Ala Val Glu Gly Val His
 565 570 575
 tac att gca gac cac ctg cga gca gaa gat gca gat ttc tca gtg aag 1776
 Tyr Ile Ala Asp His Leu Arg Ala Glu Asp Ala Asp Phe Ser Val Lys
 580 585 590
 gaa gac tgg aag tac gta gca atg gtc att gac cgg atc ttt ctc tgg 1824
 Glu Asp Trp Lys Tyr Val Ala Met Val Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp
 595 600 605
 atg ttc atc atc gtg tgt ttg ctg ggg acc gtt ggg ctc ttc ctc ccg 1872
 Met Phe Ile Ile Val Cys Leu Leu Gly Thr Val Gly Leu Phe Leu Pro
 610 615 620
 ccg tgg ctg gca gga atg atc taa 1896

Pro Trp Leu Ala Gly Met Ile

625

630

<210> 7

<211> 631

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifizierte
alpha 4-Untereinheit des nikotinischen
Acetylcholinrezeptors des Huhns

<400> 7

Met Gly Phe Leu Val Ser Lys Gly Asn Leu Leu Leu Leu Cys Ala
1 5 10 15

Ser Ile Phe Pro Ala Phe Gly His Val Glu Thr Arg Ala His Ala Glu
20 25 30

Glu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Phe Ser Gly Tyr Asn Lys Trp Ser Arg
35 40 45

Pro Val Ala Asn Ile Ser Asp Val Val Leu Val Arg Phe Gly Leu Ser
50 55 60

Ile Ala Gln Leu Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Met Met Thr Thr
65 70 75 80

Asn Val Trp Val Lys Gln Glu Trp His Asp Tyr Lys Leu Arg Trp Asp
85 90 95

Pro Gln Glu Tyr Glu Asn Val Thr Ser Ile Arg Ile Pro Ser Glu Leu
100 105 110

Ile Trp Arg Pro Asp Ile Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Asn Phe
115 120 125

Glu Val Thr Leu Ala Thr Lys Ala Thr Leu Asn Tyr Thr Gly Arg Val
130 135 140

Glu Trp Arg Pro Pro Ala Ile Tyr Lys Ser Ser Cys Glu Ile Asp Val
145 150 155 160

Glu Tyr Phe Pro Phe Asp Gln Gln Thr Cys Val Met Lys Phe Gly Ser
165 170 175

Trp Thr Tyr Asp Gly Phe Gln Val Asp Leu Arg His Ile Asp Glu Ala
180 185 190

Arg Gly Thr Asn Val Val Glu Leu Gly Val Asp Leu Ser Glu Phe Tyr
195 200 205

Thr Ser Val Glu Trp Asp Ile Leu Glu Val Pro Ala Val Arg Asn Glu
210 215 220

Lys Phe Tyr Thr Cys Cys Asp Glu Ile Tyr Pro Asp Ile Thr Tyr Ser
225 230 235 240

Phe Ile Ile Arg Arg Leu Pro Leu Phe Tyr Thr Ile Asn Leu Ile Ile
245 250 255

Pro Cys Leu Leu Ile Ser Cys Leu Thr Val Leu Val Phe Tyr Leu Pro
260 265 270

Ser Glu Cys Gly Glu Lys Ile Thr Leu Cys Ile Ser Val Leu Leu Ser
275 280 285

Leu Thr Val Phe Leu Leu Ile Thr Glu Ile Ile Pro Ser Thr Ser
290 295 300

Leu Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Leu Phe Thr Met Ile Phe
305 310 315 320

Val Thr Leu Ser Ile Ile Ile Thr Val Phe Val Leu Asn Val His His
325 330 335

Arg Ser Pro Arg Thr His Thr Met Pro Asp Trp Val Arg Arg Val Phe
340 345 350

Leu Asp Ile Val Pro Arg Leu Leu Phe Met Lys Arg Pro Ser Thr Val
355 360 365

Lys Asp Asn Cys Lys Lys Leu Ile Glu Ser Met His Lys Leu Thr Asn
370 375 380

Ser Pro Arg Leu Trp Ser Glu Thr Asp Met Glu Pro Asn Phe Thr Thr
385 390 395 400

Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gln Ser Asn Glu Pro Ser Pro Thr Ser Ser
405 410 415

Phe Cys Ala His Leu Glu Glu Pro Ala Lys Pro Met Cys Lys Ser Pro
420 425 430

Ser Gly Gln Tyr Ser Met Leu His Pro Glu Pro Pro Gln Val Thr Cys
435 440 445

Ser Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Pro Leu Ser Asp Thr Gln Thr Thr
450 455 460

Ser Ile Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ser Val Gln Gln Met Tyr Ser Pro
465 470 475 480

Asn Lys Thr Glu Glu Gly Ser Ile Arg Cys Arg Ser Arg Ser Ile Gln
485 490 495

Tyr Cys Tyr Leu Gln Glu Asp Ser Ser Gln Thr Asn Gly His Ser Ser
500 505 510

Ala Ser Pro Ala Ser Gln Arg Cys His Leu Asn Glu Gln Pro Gln
515 520 525

His Lys Pro His Gln Cys Lys Cys Lys Cys Arg Lys Gly Glu Ala Ala
530 535 540

Gly Thr Pro Thr Gln Gly Ser Lys Ser His Ser Asn Lys Gly Glu His
545 550 555 560

Leu Val Leu Met Ser Pro Ala Leu Lys Leu Ala Val Glu Gly Val His
565 570 575

Tyr Ile Ala Asp His Leu Arg Ala Glu Asp Ala Asp Phe Ser Val Lys
580 585 590

Glu Asp Trp Lys Tyr Val Ala Met Val Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp
595 600 605

Met Phe Ile Ile Val Cys Leu Leu Gly Thr Val Gly Leu Phe Leu Pro
610 615 620

Pro Trp Leu Ala Gly Met Ile
625 630

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 8

ccggagctca tctggcgccc ggacatagtc

30

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 9
ccgagatctc gtcgcagcac gtgtagaact

30

<210> 10
<211> 1896
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1893)

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifizierte
alpha 4-Untereinheit des nikotinischen
Acetylcholinrezeptors des Huhns

<400> 10
atg gga ttt ctc gtg tcg aag gga aac ctc ctc ctc ctg ctg tgt gcc 48
Met Gly Phe Leu Val Ser Lys Gly Asn Leu Leu Leu Leu Cys Ala
1 5 10 15

agc atc ttc ccc gct ttc ggc cac gtg gaa acg cga gcc cat gcg gag 96
Ser Ile Phe Pro Ala Phe Gly His Val Glu Thr Arg Ala His Ala Glu
20 25 30

gag cgc ctc ctg aag aaa ctc ttc tcc ggg tat aac aag tgg tcc cgt 144
Glu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Phe Ser Gly Tyr Asn Lys Trp Ser Arg
35 40 45

ccc gtc gcc aac att tcg gat gtg gtc ctg gtc cgc ttc ggc ttg tcc 192
Pro Val Ala Asn Ile Ser Asp Val Val Leu Val Arg Phe Gly Leu Ser
50 55 60

ata gcc cag ctc atc gat gtt gat gag aag aac caa atg atg acc aca 240
Ile Ala Gln Leu Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Met Met Thr Thr

65	70	75	80	
aat gtg tgg gtg aag cag gag tgg cac gac tac aag ctg cgc tgg gac				288
Asn Val Trp Val Lys Gln Glu Trp His Asp Tyr Lys Leu Arg Trp Asp				
85	90		95	
ccc cag gag tat gaa aac gtc aca tcc atc cga atc ccc tca gag ctc				336
Pro Gln Glu Tyr Glu Asn Val Thr Ser Ile Arg Ile Pro Ser Glu Leu				
100	105		110	
atc tgg agg ccg gac att gtc cta tac aac aat gct gat ggt gac ttt				384
Ile Trp Arg Pro Asp Ile Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Asp Phe				
115	120		125	
gca gtc acc cac ctg acc aaa gcc cac ctc ttc tat gat ggg aga att				432
Ala Val Thr His Leu Thr Lys Ala His Leu Phe Tyr Asp Gly Arg Ile				
130	135		140	
aaa tgg atg cca cct gcc atc tac aaa agc tcc tgc agc atc gat gtt				480
Lys Trp Met Pro Pro Ala Ile Tyr Lys Ser Ser Cys Ser Ile Asp Val				
145	150		155	160
acc ttc ttc ccc ttt gat cag caa aac tgt aaa atg aaa ttt ggc tct				528
Thr Phe Phe Pro Phe Asp Gln Gln Asn Cys Lys Met Lys Phe Gly Ser				
165	170		175	
tgg aca tat gac aaa gct aag ata gac ttg gtg agc atg cat agc cat				576
Trp Thr Tyr Asp Lys Ala Lys Ile Asp Leu Val Ser Met His Ser His				
180	185		190	
cgc ggg acc aac gtg gtg gag ctg ggc gtg gac caa ctg gac tac tgg				624
Arg Gly Thr Asn Val Val Glu Leu Gly Val Asp Gln Leu Asp Tyr Trp				
195	200		205	
gaa agc ggg gag tgg gtc atc att aat gcc gtg ggc aat tac aac agc				672
Glu Ser Gly Glu Trp Val Ile Ile Asn Ala Val Gly Asn Tyr Asn Ser				
210	215		220	
aag aaa tat gaa tgc tgc aca gag atc tac cct gat ata act tac tcc				720
Lys Lys Tyr Glu Cys Cys Thr Glu Ile Tyr Pro Asp Ile Thr Tyr Ser				
225	230		235	240
ttc att atc cgg agg ctg ccg ctg ttc tac aca atc aat ttg atc att				768
Phe Ile Ile Arg Arg Leu Pro Leu Phe Tyr Thr Ile Asn Leu Ile Ile				
245	250		255	
ccc tgc ctg ctt atc tcc tgc ttg act gtc ctg gtc ttc tac cta ccc				816
Pro Cys Leu Leu Ile Ser Cys Leu Thr Val Leu Val Phe Tyr Leu Pro				

260

265

270

tct gag tgc gga gag aag ata acc ttg tgc atc tct gtg ctg cta tcc 864
 Ser Glu Cys Gly Glu Lys Ile Thr Leu Cys Ile Ser Val Leu Leu Ser
 275 280 285

ctc acg gtg ttc ctg ctg ctc atc aca gag atc atc cct tct acc tcc 912
 Leu Thr Val Phe Leu Leu Ile Thr Glu Ile Ile Pro Ser Thr Ser
 290 295 300

ctg gtc atc ccc ctg ata gga gag tat ctg ctc ttc acc atg ata ttt 960
 Leu Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Leu Phe Thr Met Ile Phe
 305 310 315 320

gtc acc ttg tct atc atc act gtc ttt gtg ctc aac gta cac cac 1008
 Val Thr Leu Ser Ile Ile Thr Val Phe Val Leu Asn Val His His
 325 330 335

cgt tca cca cgt acc cac acg atg cct gac tgg gtg agg agg gtc ttc 1056
 Arg Ser Pro Arg Thr His Thr Met Pro Asp Trp Val Arg Arg Val Phe
 340 345 350

ctt gac ata gtc cca cgt ctc ctc ttc atg aag cgg ccc tcc aca gtg 1104
 Leu Asp Ile Val Pro Arg Leu Leu Phe Met Lys Arg Pro Ser Thr Val
 355 360 365

aaa gac aat tgc aag aag ctt att gaa tct atg cac aaa cta acc aac 1152
 Lys Asp Asn Cys Lys Lys Leu Ile Glu Ser Met His Lys Leu Thr Asn
 370 375 380

tca cca agg ctt tgg tct gag acc gac atg gag ccc aac ttc act acc 1200
 Ser Pro Arg Leu Trp Ser Glu Thr Asp Met Glu Pro Asn Phe Thr Thr
 385 390 395 400

tca tcc tcc ccc agc ccc cag agt aat gaa cct tca ccc aca tct tcc 1248
 Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gln Ser Asn Glu Pro Ser Pro Thr Ser Ser
 405 410 415

ttc tgt gcc cac ctt gag gag cca gcc aaa cct atg tgc aaa tcc cct 1296
 Phe Cys Ala His Leu Glu Glu Pro Ala Lys Pro Met Cys Lys Ser Pro
 420 425 430

tct gga cag tac tca atg ctg cac cct gag ccc cca cag gtg acg tgt 1344
 Ser Gly Gln Tyr Ser Met Leu His Pro Glu Pro Pro Gln Val Thr Cys
 435 440 445

tcc tct ccg aag ccc tcc tgc cac ccc ctg agt gac acc cag acc aca 1392
 Ser Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Pro Leu Ser Asp Thr Gln Thr Thr

450	455	460	
tct atc tca aaa ggc aga tcg ctc agt gtt cag cag atg tac agc ccc Ser Ile Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ser Val Gln Gln Met Tyr Ser Pro			
465	470	475	1440
aat aag aca gag gaa ggg agc atc cgc tgt agg tcc cga agc atc cag Asn Lys Thr Glu Glu Gly Ser Ile Arg Cys Arg Ser Arg Ser Ile Gln			
485	490	495	1488
tac tgt tac ctg cag gag gac tct tcc cag acc aat ggc cac tct agt Tyr Cys Tyr Leu Gln Glu Asp Ser Ser Gln Thr Asn Gly His Ser Ser			
500	505	510	1536
gcc tct cca gcg tcg cag cgc tgc cac ctc aat gaa gag cag ccc cag Ala Ser Pro Ala Ser Gln Arg Cys His Leu Asn Glu Glu Gln Pro Gln			
515	520	525	1584
cac aag ccc cac cag tgc aag tgt aag tgc aga aag gga gag gca gct His Lys Pro His Gln Cys Lys Cys Lys Cys Arg Lys Gly Glu Ala Ala			
530	535	540	1632
ggc aca ccg actcaa gga agc aag agc cac agc aac aaa gga gaa cac Gly Thr Pro Thr Gln Gly Ser Lys Ser His Ser Asn Lys Gly Glu His			
545	550	555	1680
ctc gtg ctg atg tcc cca gcc ctg aag ctg gcg gtg gaa ggg gtc cac Leu Val Leu Met Ser Pro Ala Leu Lys Leu Ala Val Glu Gly Val His			
565	570	575	1728
tac att gca gac cac ctg cga gca gaa gat gca gat ttc tca gtg aag Tyr Ile Ala Asp His Leu Arg Ala Glu Asp Ala Asp Phe Ser Val Lys			
580	585	590	1776
gaa gac tgg aag tac gta gca atg gtc att gac cgg atc ttt ctc tgg Glu Asp Trp Lys Tyr Val Ala Met Val Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp			
595	600	605	1824
atg ttc atc atc gtg tgt ttg ctg ggg acc gtt ggg ctc ttc ctc ccg Met Phe Ile Ile Val Cys Leu Leu Gly Thr Val Gly Leu Phe Leu Pro			
610	615	620	1872
ccg tgg ctg gca gga atg atc taa Pro Trp Leu Ala Gly Met Ile			
625	630		1896

<211> 631
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifizierte
alpha 4-Untereinheit des nikotinischen
Acetylcholinrezeptors des Huhns

<400> 11
Met Gly Phe Leu Val Ser Lys Gly Asn Leu Leu Leu Leu Cys Ala
1 5 10 15

Ser Ile Phe Pro Ala Phe Gly His Val Glu Thr Arg Ala His Ala Glu
20 25 30

Glu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Phe Ser Gly Tyr Asn Lys Trp Ser Arg
35 40 45

Pro Val Ala Asn Ile Ser Asp Val Val Leu Val Arg Phe Gly Leu Ser
50 55 60

Ile Ala Gln Leu Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Met Met Thr Thr
65 70 75 80

Asn Val Trp Val Lys Gln Glu Trp His Asp Tyr Lys Leu Arg Trp Asp
85 90 95

Pro Gln Glu Tyr Glu Asn Val Thr Ser Ile Arg Ile Pro Ser Glu Leu
100 105 110

Ile Trp Arg Pro Asp Ile Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Asp Phe
115 120 125

Ala Val Thr His Leu Thr Lys Ala His Leu Phe Tyr Asp Gly Arg Ile
130 135 140

Lys Trp Met Pro Pro Ala Ile Tyr Lys Ser Ser Cys Ser Ile Asp Val
145 150 155 160

Thr Phe Phe Pro Phe Asp Gln Gln Asn Cys Lys Met Lys Phe Gly Ser
165 170 175

Trp Thr Tyr Asp Lys Ala Lys Ile Asp Leu Val Ser Met His Ser His
180 185 190

Arg Gly Thr Asn Val Val Glu Leu Gly Val Asp Gln Leu Asp Tyr Trp
195 200 205

Glu Ser Gly Glu Trp Val Ile Ile Asn Ala Val Gly Asn Tyr Asn Ser

210 215 220
Lys Lys Tyr Glu Cys Cys Thr Glu Ile Tyr Pro Asp Ile Thr Tyr Ser
225 230 235 240
Phe Ile Ile Arg Arg Leu Pro Leu Phe Tyr Thr Ile Asn Leu Ile Ile
245 250 255
Pro Cys Leu Leu Ile Ser Cys Leu Thr Val Leu Val Phe Tyr Leu Pro
260 265 270
Ser Glu Cys Gly Glu Lys Ile Thr Leu Cys Ile Ser Val Leu Leu Ser
275 280 285
Leu Thr Val Phe Leu Leu Ile Thr Glu Ile Ile Pro Ser Thr Ser
290 295 300
Leu Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Tyr Leu Leu Phe Thr Met Ile Phe
305 310 315 320
Val Thr Leu Ser Ile Ile Ile Thr Val Phe Val Leu Asn Val His His
325 330 335
Arg Ser Pro Arg Thr His Thr Met Pro Asp Trp Val Arg Arg Val Phe
340 345 350
Leu Asp Ile Val Pro Arg Leu Leu Phe Met Lys Arg Pro Ser Thr Val
355 360 365
Lys Asp Asn Cys Lys Lys Leu Ile Glu Ser Met His Lys Leu Thr Asn
370 375 380
Ser Pro Arg Leu Trp Ser Glu Thr Asp Met Glu Pro Asn Phe Thr Thr
385 390 395 400
Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gln Ser Asn Glu Pro Ser Pro Thr Ser Ser
405 410 415
Phe Cys Ala His Leu Glu Glu Pro Ala Lys Pro Met Cys Lys Ser Pro
420 425 430
Ser Gly Gln Tyr Ser Met Leu His Pro Glu Pro Pro Gln Val Thr Cys
435 440 445
Ser Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Pro Leu Ser Asp Thr Gln Thr Thr
450 455 460
Ser Ile Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ser Val Gln Gln Met Tyr Ser Pro

465	470	475	480
Asn Lys Thr Glu Glu Gly Ser Ile Arg Cys Arg Ser Arg Ser Ile Gln			
485		490	495
Tyr Cys Tyr Leu Gln Glu Asp Ser Ser Gln Thr Asn Gly His Ser Ser			
500		505	510
Ala Ser Pro Ala Ser Gln Arg Cys His Leu Asn Glu Glu Gln Pro Gln			
515		520	525
His Lys Pro His Gln Cys Lys Cys Lys Cys Arg Lys Gly Glu Ala Ala			
530		535	540
Gly Thr Pro Thr Gln Gly Ser Lys Ser His Ser Asn Lys Gly Glu His			
545		550	555
Leu Val Leu Met Ser Pro Ala Leu Lys Leu Ala Val Glu Gly Val His			
565		570	575
Tyr Ile Ala Asp His Leu Arg Ala Glu Asp Ala Asp Phe Ser Val Lys			
580		585	590
Glu Asp Trp Lys Tyr Val Ala Met Val Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp			
595		600	605
Met Phe Ile Ile Val Cys Leu Leu Gly Thr Val Gly Leu Phe Leu Pro			
610		615	620
Pro Trp Leu Ala Gly Met Ile			
625		630	

<210> 12

<211> 81

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 12

gctaaagatag acttgagaca catcgatgag gctagaggaa ccaacgtggc agaactgggt 60
gtggaccaac tggactactg g

81

<210> 13

<211> 81
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 13
 ccagtagtcc agttggtcca cacccagtcc taccacgttg gttcctctag cctcatcgat 60
 gtgtctcaag tctatcttag c 81

<210> 14
 <211> 1869
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1866)

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifizierte
 alpha 4-Untereinheit des nikotinischen
 Acetylcholinrezeptors des Huhns

<400> 14
 atg gga ttt ctc gtg tcg aag gga aac ctc ctc ctc ctg ctg tgt gcc 48
 Met Gly Phe Leu Val Ser Lys Gly Asn Leu Leu Leu Leu Cys Ala
 1 5 10 15

agc atc ttc ccc gct ttc ggc cac gtg gaa acg cga gcc cat gcg gag 96
 Ser Ile Phe Pro Ala Phe Gly His Val Glu Thr Arg Ala His Ala Glu
 20 25 30

gag cgc ctc ctg aag aaa ctc ttc tcc ggg tat aac aag tgg tcc cgt 144
 Glu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Phe Ser Gly Tyr Asn Lys Trp Ser Arg
 35 40 45

ccc gtc gcc aac att tcg gat gtg gtc ctg gtc cgc ttc ggc ttg tcc 192
 Pro Val Ala Asn Ile Ser Asp Val Val Leu Val Arg Phe Gly Leu Ser
 50 55 60

ata gcc cag ctc atc gat gtt gat gag aag aac caa atg atg acc aca 240
 Ile Ala Gln Leu Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Met Met Thr Thr
 65 70 75 80

aat gtg tgg gtg aag cag gag tgg cac gac tac aag ctg cgc tgg gac 288

Asn Val Trp Val Lys Gln Glu Trp His Asp Tyr Lys Leu Arg Trp Asp
 85 90 95
 ccc cag gag tat gaa aac gtc aca tcc atc cga atc ccc tca gag ctc 336
 Pro Gln Glu Tyr Glu Asn Val Thr Ser Ile Arg Ile Pro Ser Glu Leu
 100 105 110
 atc tgg agg ccg gac att gtc cta tac aac aat gct gat ggt gac ttt 384
 Ile Trp Arg Pro Asp Ile Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Asp Phe
 115 120 125
 gca gtc acc cac ctg acc aaa gcc cac ctc ttc tat gat ggg aga att 432
 Ala Val Thr His Leu Thr Lys Ala His Leu Phe Tyr Asp Gly Arg Ile
 130 135 140
 aaa tgg atg cca cct gcc atc tac aaa agc tcc tgc agc atc gat gtt 480
 Lys Trp Met Pro Pro Ala Ile Tyr Lys Ser Ser Cys Ser Ile Asp Val
 145 150 155 160
 acc ttc ttc ccc ttt gat cag caa aac tgt aaa atg aaa ttt ggc tct 528
 Thr Phe Phe Pro Phe Asp Gln Gln Asn Cys Lys Met Lys Phe Gly Ser
 165 170 175
 tgg aca tat gac aaa gct aag ata gac ttg gtg agc atg cat agc cat 576
 Trp Thr Tyr Asp Lys Ala Lys Ile Asp Leu Val Ser Met His Ser His
 180 185 190
 gtc gac ctg tcc gag ttc tac acc tcc gtg gag tgg gac atc ctg gag 624
 Val Asp Leu Ser Glu Phe Tyr Thr Ser Val Glu Trp Asp Ile Leu Glu
 195 200 205
 gtg cca gcc gtc agg aac gag aag ttc tac acg tgc tgc gac gag ccc 672
 Val Pro Ala Val Arg Asn Glu Lys Phe Tyr Thr Cys Cys Asp Glu Pro
 210 215 220
 tac ctg gac ata acg ttt aac ttc att atc cgg agg ctg ccg ctg ttc 720
 Tyr Leu Asp Ile Thr Phe Asn Phe Ile Arg Arg Leu Pro Leu Phe
 225 230 235 240
 tac aca atc aat ttg atc att ccc tgc ctg ctt atc tcc tgc ttg act 768
 Tyr Thr Ile Asn Leu Ile Ile Pro Cys Leu Leu Ile Ser Cys Leu Thr
 245 250 255
 gtc ctg gtc ttc tac cta ccc tct gag tgc gga gag aag ata acc ttg 816
 Val Leu Val Phe Tyr Leu Pro Ser Glu Cys Gly Glu Lys Ile Thr Leu
 260 265 270
 tgc atc tct gtg ctg cta tcc ctc acg gtg ttc ctg ctg ctc atc aca 864
 tgc atc tct gtg ctg cta tcc ctc acg gtg ttc ctg ctg ctc atc aca

Cys	Ile	Ser	Val	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Val	Phe	Leu	Leu	Leu	Ile	Thr	
275				280					285							
gag atc atc cct tct acc tcc ctg gtc atc ccc ctg ata gga gag tat															912	
Glu	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Ser	Leu	Val	Ile	Pro	Leu	Ile	Gly	Tyr		
290			295						300							
ctg ctc ttc acc atg ata ttt gtc acc ttg tct atc atc atc act gtc															960	
Leu	Leu	Phe	Thr	Met	Ile	Phe	Val	Thr	Leu	Ser	Ile	Ile	Ile	Thr	Val	
305			310					315						320		
ttt gtg ctc aac gta cac cac cgt tca cca cgt acc cac acg atg cct															1008	
Phe	Val	Leu	Asn	Val	His	His	Arg	Ser	Pro	Arg	Thr	His	Thr	Met	Pro	
325			330					335								
gac tgg gtg agg agg gtc ttc ctt gac ata gtc cca cgt ctc ctc ttc															1056	
Asp	Trp	Val	Arg	Arg	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Val	Pro	Arg	Leu	Leu	Phe	
340			345					350								
atg aag cgg ccc tcc aca gtg aaa gac aat tgc aag aag ctt att gaa															1104	
Met	Lys	Arg	Pro	Ser	Thr	Val	Lys	Asp	Asn	Cys	Lys	Lys	Leu	Ile	Glu	
355			360					365								
tct atg cac aaa cta acc aac tca cca agg ctt tgg tct gag acc gac															1152	
Ser	Met	His	Lys	Leu	Thr	Asn	Ser	Pro	Arg	Leu	Trp	Ser	Glu	Thr	Asp	
370			375					380								
atg gag ccc aac ttc act acc tca tcc tcc ccc agc ccc cag agt aat															1200	
Met	Glu	Pro	Asn	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Pro	Gln	Ser	Asn		
385			390					395				400				
gaa cct tca ccc aca tct tcc ttc tgt gcc cac ctt gag gag cca gcc															1248	
Glu	Pro	Ser	Pro	Thr	Ser	Ser	Phe	Cys	Ala	His	Leu	Glu	Pro	Ala		
405			410					415								
aaa cct atg tgc aaa tcc cct tct gga cag tac tca atg ctg cac cct															1296	
Lys	Pro	Met	Cys	Lys	Ser	Pro	Ser	Gly	Gln	Tyr	Ser	Met	Leu	His	Pro	
420			425					430								
gag ccc cca cag gtg acg tgt tcc tct ccg aag ccc tcc tgc cac ccc															1344	
Glu	Pro	Pro	Gln	Val	Thr	Cys	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Ser	Cys	His	Pro	
435			440					445								
ctg agt gac acc cag acc aca tct atc tca aaa ggc aga tcg ctc agt															1392	
Leu	Ser	Asp	Thr	Gln	Thr	Ser	Ile	Ser	Lys	Gly	Arg	Ser	Leu	Ser		
450			455					460								
gtt cag cag atg tac agc ccc aat aag aca gag gaa ggg agc atc cgc															1440	

Val Gln Gln Met Tyr Ser Pro Asn Lys Thr Glu Glu Gly Ser Ile Arg				
465	470	475	480	
tgt agg tcc cga agc atc cag tac tgt tac ctg cag gag gac tct tcc				1488
Cys Arg Ser Arg Ser Ile Gln Tyr Cys Tyr Leu Gln Glu Asp Ser Ser				
485	490	495		
cag acc aat ggc cac tct agt gcc tct cca gcg tcg cag cgc tgc cac				1536
Gln Thr Asn Gly His Ser Ser Ala Ser Pro Ala Ser Gln Arg Cys His				
500	505	510		
ctc aat gaa gag cag ccc cag cac aag ccc cac cag tgc aag tgt aag				1584
Leu Asn Glu Glu Gln Pro Gln His Lys Pro His Gln Cys Lys Cys Lys				
515	520	525		
tgc aga aag gga gag gca gct ggc aca ccg act caa gga agc aag agc				1632
Cys Arg Lys Gly Glu Ala Ala Gly Thr Pro Thr Gln Gly Ser Lys Ser				
530	535	540		
cac agc aac aaa gga gaa cac ctc gtg ctg atg tcc cca gcc ctg aag				1680
His Ser Asn Lys Gly Glu His Leu Val Leu Met Ser Pro Ala Leu Lys				
545	550	555	560	
ctg gcg gtg gaa ggg gtc cac tac att gca gac cac ctg cga gca gaa				1728
Leu Ala Val Glu Gly Val His Tyr Ile Ala Asp His Leu Arg Ala Glu				
565	570	575		
gat gca gat ttc tca gtg aag gaa gac tgg aag tac gta gca atg gtc				1776
Asp Ala Asp Phe Ser Val Lys Glu Asp Trp Lys Tyr Val Ala Met Val				
580	585	590		
att gac cgg atc ttt ctc tgg atg ttc atc atc gtg tgt ttg ctg ggg				1824
Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp Met Phe Ile Ile Val Cys Leu Leu Gly				
595	600	605		
acc gtt ggg ctc ttc ctc ccg tgg ctg gca gga atg atc taa				1869
Thr Val Gly Leu Phe Leu Pro Pro Trp Leu Ala Gly Met Ile				
610	615	620		

<210> 15

<211> 622

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Modifizierte
alpha 4-Untereinheit des nikotinischen
Acetylcholinrezeptors des Huhns

<400> 15

Met Gly Phe Leu Val Ser Lys Gly Asn Leu Leu Leu Leu Cys Ala

1

5

10

15

Ser Ile Phe Pro Ala Phe Gly His Val Glu Thr Arg Ala His Ala Glu

20

25

30

Glu Arg Leu Leu Lys Lys Leu Phe Ser Gly Tyr Asn Lys Trp Ser Arg

35

40

45

Pro Val Ala Asn Ile Ser Asp Val Val Arg Phe Gly Leu Ser

50

55

60

Ile Ala Gln Leu Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Met Met Thr Thr

65

70

75

80

Asn Val Trp Val Lys Gln Glu Trp His Asp Tyr Lys Leu Arg Trp Asp

85

90

95

Pro Gln Glu Tyr Glu Asn Val Thr Ser Ile Arg Ile Pro Ser Glu Leu

100

105

110

Ile Trp Arg Pro Asp Ile Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Gly Asp Phe

115

120

125

Ala Val Thr His Leu Thr Lys Ala His Leu Phe Tyr Asp Gly Arg Ile

130

135

140

Lys Trp Met Pro Pro Ala Ile Tyr Lys Ser Ser Cys Ser Ile Asp Val

145

150

155

160

Thr Phe Phe Pro Phe Asp Gln Gln Asn Cys Lys Met Lys Phe Gly Ser

165

170

175

Trp Thr Tyr Asp Lys Ala Lys Ile Asp Leu Val Ser Met His Ser His

180

185

190

Val Asp Leu Ser Glu Phe Tyr Thr Ser Val Glu Trp Asp Ile Leu Glu

195

200

205

Val Pro Ala Val Arg Asn Glu Lys Phe Tyr Thr Cys Cys Asp Glu Pro

210

215

220

Tyr Leu Asp Ile Thr Phe Asn Phe Ile Ile Arg Arg Leu Pro Leu Phe

225

230

235

240

Tyr Thr Ile Asn Leu Ile Ile Pro Cys Leu Leu Ile Ser Cys Leu Thr

245

250

255

Val Leu Val Phe Tyr Leu Pro Ser Glu Cys Gly Glu Lys Ile Thr Leu
260 265 270

Cys Ile Ser Val Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Leu Leu Leu Ile Thr
275 280 285

Glu Ile Ile Pro Ser Thr Ser Leu Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Tyr
290 295 300

Leu Leu Phe Thr Met Ile Phe Val Thr Leu Ser Ile Ile Ile Thr Val
305 310 315 320

Phe Val Leu Asn Val His His Arg Ser Pro Arg Thr His Thr Met Pro
325 330 335

Asp Trp Val Arg Arg Val Phe Leu Asp Ile Val Pro Arg Leu Leu Phe
340 345 350

Met Lys Arg Pro Ser Thr Val Lys Asp Asn Cys Lys Lys Leu Ile Glu
355 360 365

Ser Met His Lys Leu Thr Asn Ser Pro Arg Leu Trp Ser Glu Thr Asp
370 375 380

Met Glu Pro Asn Phe Thr Thr Ser Ser Ser Pro Ser Pro Gln Ser Asn
385 390 395 400

Glu Pro Ser Pro Thr Ser Ser Phe Cys Ala His Leu Glu Glu Pro Ala
405 410 415

Lys Pro Met Cys Lys Ser Pro Ser Gly Gln Tyr Ser Met Leu His Pro
420 425 430

Glu Pro Pro Gln Val Thr Cys Ser Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Pro
435 440 445

Leu Ser Asp Thr Gln Thr Thr Ser Ile Ser Lys Gly Arg Ser Leu Ser
450 455 460

Val Gln Gln Met Tyr Ser Pro Asn Lys Thr Glu Glu Gly Ser Ile Arg
465 470 475 480

Cys Arg Ser Arg Ser Ile Gln Tyr Cys Tyr Leu Gln Glu Asp Ser Ser
485 490 495

Gln Thr Asn Gly His Ser Ser Ala Ser Pro Ala Ser Gln Arg Cys His
500 505 510

Leu Asn Glu Glu Gln Pro Gln His Lys Pro His Gln Cys Lys Cys Lys
515 520 525

Cys Arg Lys Gly Glu Ala Ala Gly Thr Pro Thr Gln Gly Ser Lys Ser
530 535 540

His Ser Asn Lys Gly Glu His Leu Val Leu Met Ser Pro Ala Leu Lys
545 550 555 560

Leu Ala Val Glu Gly Val His Tyr Ile Ala Asp His Leu Arg Ala Glu
565 570 575

Asp Ala Asp Phe Ser Val Lys Glu Asp Trp Lys Tyr Val Ala Met Val
580 585 590

Ile Asp Arg Ile Phe Leu Trp Met Phe Ile Ile Val Cys Leu Leu Gly
595 600 605

Thr Val Gly Leu Phe Leu Pro Pro Trp Leu Ala Gly Met Ile
610 615 620

<210> 16

<211> 79

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 16

caacagcaag aaatatgaat gctgcgacga gccctacctt gatataactt tcaacttcat 60
tatccggagg ctgccgctg 79

<210> 17

<211> 79

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 17

cagcggcagc ctccggataa tgaagttgaa agttatatca aggttagggct cgtcgagca 60
ttcatatttc ttgctgttg 79

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 18
gaacaaaagc tggaggtcca ccgcgggtggc 30

<210> 19
<211> 30
● ● <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 19
gccaccgcgg tggacctcca gctttgttc 30

<210> 20
<211> 75
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 20
gcggggagtg ggtcatctta gaagtcccg ccgttcgcaa cgaaaagttt tatacatgct 60
gcgacgagcc ctacc 75

<210> 21
<211> 75
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 21

ggtagggctc gtcgcagcat gtataaaact tttcggttgcg aacggccggg acttcaatga 60
tgaccctactc cccgc

75